

10/553124
JC20 Rec'd PCT/PTO 14 OCT 2004

DOCKET NO.: 279689US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Noboru ENDO, et al.
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HERewith
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP04/05403
INTERNATIONAL FILING DATE: April 15, 2004
FOR: GENE CAPABLE OF IMPARTING SALT STRESS RESISTANCE

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	2003-113194	17 April 2003
Japan	2004-075932	17 March 2004

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP04/05403. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Corwin P. Umbach, Ph.D.
Registration No. 40,211

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

PCT/JP 2004/005403

15. 4. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 4月17日

出願番号
Application Number: 特願2003-113194

[ST. 10/C]: [JP 2003-113194]

出願人
Applicant(s): 大成建設株式会社

REC'D 10 JUN 2004

WIPO

PCT

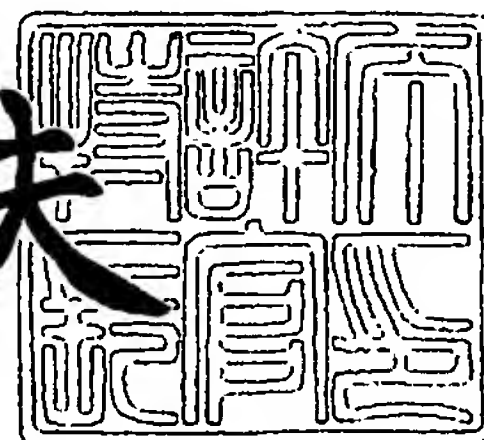
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3045057

【書類名】 特許願

【整理番号】 P03-0142

【提出日】 平成15年 4月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 塩ストレス耐性を付与する遺伝子

【請求項の数】 12

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿一丁目 2 5 番 1 号 大成建設株式会
社内

 【氏名】 遠藤 昇

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿一丁目 2 5 番 1 号 大成建設株式会
社内

 【氏名】 吉田 光毅

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿一丁目 2 5 番 1 号 大成建設株式会
社内

 【氏名】 秋吉 美穂

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都武蔵野市御殿山 1 - 8 - 1

 【氏名】 吉田 泰子

【特許出願人】

 【識別番号】 000206211

 【氏名又は名称】 大成建設株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100120905

【弁理士】

【氏名又は名称】 深見 伸子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9604335

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 塩ストレス耐性を付与する遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)又は(b)に示すタンパク質をコードする遺伝子。

- (a) 配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質
- (b) 配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつUDPグルコース 4-エピメラーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 2】 以下の(c)又は(d)に示すDNAからなる遺伝子。

- (c) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるDNA
- (d) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUDPグルコース 4-エピメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 4】 請求項 1 若しくは 2 に記載の遺伝子、又は請求項 3 に記載の組換えベクターを導入した塩ストレス耐性形質転換植物。

【請求項 5】 植物が単子葉植物である、請求項 4 に記載の塩ストレス耐性形質転換植物。

【請求項 6】 単子葉植物がイネ科、ユリ科、又はショウガ科に属する植物である、請求項 5 に記載の塩ストレス耐性形質転換植物。

【請求項 7】 イネ科に属する植物が、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ、シバ、ソルガム、アワ、及びヒエから成る群から選択される、請求項 6 に記載の塩ストレス耐性形質転換植物。

【請求項 8】 請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子を含有する形質転換植物選抜用マーカー。

【請求項 9】 植物が単子葉植物である、請求項 8 に記載の形質転換植物選抜用マーカー。

【請求項 10】 単子葉植物がイネ科、ユリ科、又はショウガ科に属する植物である、請求項 9 に記載の形質転換植物選抜用マーカー。

【請求項 11】 イネ科に属する植物が、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ、シバ、ソルガム、アワ、及びヒエから成る群から選択される、請求項 10 に記載の形質転換植物選抜用マーカ。

【請求項 12】 請求項 1 若しくは 2 に記載の遺伝子、又は請求項 3 に記載の組換えベクターを植物に導入し、その植物をガラクトース含有培地にて培養し、ガラクトース耐性の有無を指標に前記遺伝子が導入された植物として選抜することを含む、形質転換植物の選抜方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、塩ストレス耐性を付与する遺伝子、及び該遺伝子を導入した形質転換植物等に関する。

【0002】

【従来の技術】

植物が受ける環境ストレスには、塩、乾燥、高温、低温、強光、空気汚染等があるが、農業生産の観点から最も問題となっているのが、塩害及び乾燥である。塩害はもともと塩分の高い地域のみならず、灌漑を行うことによりそれまで問題のなかった農地においても発生している。現在、アジアでは1200万ヘクタールの耕地が塩害や干ばつの被害を受けており、実際に950万ヘクタールの耕地が塩害のため未使用のままになっている。特に、イネはアジアにおける主要穀物であるのでイネに塩ストレス耐性が付与できれば未使用の農地も食料生産の場に変えられて、世界の穀物生産の安定化に貢献できる。これまで、劣悪環境下や不良土壌でも栽培可能な環境ストレス耐性植物を遺伝子組換え技術を駆使して作出する種々の試みが検討されている。例えば、塩ストレスによって誘導される遺伝子を単離し、該遺伝子を発現させることで、耐塩性植物の作出が可能になると考えられる。塩ストレス耐性付与遺伝子としてこれまでコウライシバ由来のベタイン合成酵素遺伝子（特許文献1）、*Arthrobacter globiformis*由来のコリンオキシダーゼ遺伝子（非特許文献1）、イネ由来の葉緑体型グルタミンシンターゼ（非特許文献2）、イネ由来の転写活性因子（Os DREB）（非特許文献3）、ホソバノハマ

アカザ由来の Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子（特許文献2）等が知られている。また、糖代謝・合成に関与する酵素遺伝子では、大腸菌由来のトレハロース合成関連遺伝子（非特許文献4）、UDPガラクトースからガラクチノールを合成するガラクチノール合成酵素（AtGolS）遺伝子が、乾燥・塩・低温といった水ストレス耐性付与に関与することがシロイヌナズナにおいて報告されている（非特許文献5、非特許文献6）。双子葉植物では、シロイヌナズナ由来の Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子にて形質転換したトマト（非特許文献7）やBrassica植物（非特許文献8）において200mMで10週間にわたって塩ストレス耐性を評価した例があり、果実や種子の収穫が報告されている。しかしながら、単子葉形質転換植物では移植から種子を収穫するまでという長期間の耐塩性を付与した遺伝子はない。例えば、形質転換イネで塩ストレス耐性を示した条件としては100mMで13日間、150mMで2週間、300mMで3日間と短期である。従って、苗の移植から種子の収穫までといった数週間から数カ月にもわたる実際の生産工程に対応した耐塩性形質を上記の遺伝子群が付与できるとは判断し難いのが現状である。

【0003】

UDPグルコース4-エピメラーゼは、UDPグルコースからUDPガラクトース、逆にUDPガラクトースからUDPグルコースの両方向の反応を触媒する酵素である。これまで植物由来のUDPグルコース4-エピメラーゼ遺伝子（以下、UGE遺伝子ともいう）としては、例えばシロイヌナズナ、グアーなどから単離されている（非特許文献9）。しかしながら、塩ストレス耐性を付与することのできるUGE遺伝子についてはこれまで知られていない。また、塩ストレスによってUGE遺伝子が誘導される植物種についてもこれまで報告がない。

【0004】

ガラクトースは双子葉植物シロイヌナズナの芽生えにおいて茎葉部の生長を抑制する。これは、外から与えたガラクトースを植物が利用しきれず、UDP-ガラクトースやガラクトース-1-リン酸が蓄積したことによると考えられている。しかしながら、シロイヌナズナのUGE遺伝子の35SとnosTの発現カセットを導入した植物体では、ガラクトース存在下でも生長が抑制されにくいことが報告されており、UGE遺伝子の形質転換植物用選抜マーカーとしての有用性が指摘されてい

る（非特許文献9、10参照）。また、上記UGE遺伝子導入植物体がガラクトース存在下で成長が抑制されないのはUGE遺伝子が蓄積したUDP-ガラクトースをUDP-グルコースに変換したためと考えられている。一方、ガラクトースは、単子葉植物において芽生えの一部の組織、幼葉鞘又は鞘葉、種子根のホルモン（オーキシンやジベレリンなど）による伸長生長の抑制作用があることが報告されているが（非特許文献11）、組織培養に関わる生理現象、例えば発根に対する影響などについての研究報告はない。また、イネ科を含む単子葉植物に対しては、これまでUGE遺伝子を導入し、ガラクトース存在下における生育を調べた実験報告はない。

【0005】

さらに、近年、遺伝子組換え農作物（GMO）の安全性に関して最も問題視されているのが、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性遺伝子とその組換え農作物に残存している点である。この遺伝子は、目的遺伝子の導入のうまくいった細胞を初期段階で選り分けるための選抜マーカー（マーカー遺伝子）と呼ばれるもので、細胞から植物体が再生し、さらに発根、馴化した後は不要なものである。一方、人体に影響の少ないと考えられる糖による選抜方法も近年報告されている。これらは、微生物の糖異性化酵素遺伝子をマーカーとし、キシロース（非特許文献12）やマンノース（非特許文献13）により選抜できる。しかし、これらのマーカー遺伝子は微生物由来であり、従来、人間が食物として摂取したことのないDNAであるため安全性については100%確証があるとは言い難い。従って、抗生物質耐性遺伝子に代わる安全性の高い選抜マーカー、それを用いた発現用ベクターの確立が望まれている。

【0006】

【特許文献1】

特開2001-309789号

【特許文献2】

特開2000-157287号

【非特許文献1】

Mohanty A., et al., Theor. Appl. Genet., 106, pp.51-57 (2002)

【非特許文献 2】

Hoshida H., et al., Plant Mol. Biol., 43, pp.103-111 (2000)

【非特許文献 3】

Dobouzet J. G., et al., Plant J. 33, pp.751-763 (2003)

【非特許文献 4】

Jang I.C., et al., Plant Physiol., 131, pp. 516-524 (2003)

【非特許文献 5】

細胞工学, Vol.21, No.12, pp.1455-1459 (2002)

【非特許文献 6】

Teruaki T., et al., The Plant Journal, 29(4), pp.417-426 (2002)

【非特許文献 7】

Zhang H.X., Blumwald E., Nature Biotechnol., 19, pp.765-768 (2001)

【非特許文献 8】

Zhang H.X., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA., 98, pp.12832-12836 (2001)

【非特許文献 9】

Reiter W. D., Vanzin G. F., Plant Mol. Biol., 47, pp.95-113 (2001)

【非特許文献 1 0】

Dormann P. & Benning, C., The Plant Journal, 13, pp.641-652 (1998)

【非特許文献 1 1】

Inouhe M., et al., Physiologia Plantarum, 66, pp.370-376 (1986)

【非特許文献 1 2】

Haaldrup A., et al., Plant Cell Reports, 18, pp.76-81 (1998)

【非特許文献 1 3】

Joersbo M., et al., Molecular Breeding, 4, pp.111-117 (1998)

【0 0 0 7】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、長期間に渡って植物に塩ストレス耐性を付与することが可能

な新規な遺伝子、及びその遺伝子を導入した塩ストレス耐性形質転換植物等を提供することにある。本発明の別の課題は、抗生物質耐性遺伝子に代わる安全性の高い選抜マーカーを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、海水耐性シバ (seashore paspalum) に塩ストレスによって誘導される遺伝子があることに着目し、そのクローニングを試みたところ、その遺伝子がUDPグルコース 4-エピメラーゼをコードする遺伝子であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

- (1) 以下の(a)又は(b)に示すタンパク質をコードする遺伝子。
 - (a) 配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b) 配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつUDPグルコース 4-エピメラーゼ活性を有するタンパク質
- (2) 以下の(c)又は(d)に示すDNAからなる遺伝子。
 - (c) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるDNA
 - (d) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUDPグルコース 4-エピメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA
- (3) 上記 (1) 又は (2) の遺伝子を含む組換えベクター。
- (4) 上記 (1) 若しくは (2) に記載の遺伝子、又は上記 (3) の組換えベクターを導入した塩ストレス耐性形質転換植物。
- (5) 植物が単子葉植物である、上記 (4) の塩ストレス耐性形質転換植物。
- (6) 単子葉植物がイネ科、ユリ科、又はショウガ科に属する植物である、上記 (5) の塩ストレス耐性形質転換植物。
- (7) イネ科に属する植物が、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ、シバ、ソルガム、アワ、及びヒエから成る群から選択される、上記 (6)

の塩ストレス耐性形質転換植物。

(8) 上記(1)又は(2)の遺伝子を含有する形質転換植物選抜用マーカ。

(9) 植物が単子葉植物である、上記(8)の形質転換植物選抜用マーカ。

(10) 単子葉植物がイネ科、ユリ科、又はショウガ科に属する植物である、上記(9)の形質転換植物選抜用マーカ。

(11) イネ科に属する植物が、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ、シバ、ソルガム、アワ、及びヒエから成る群から選択される、上記(10)の形質転換植物選抜用マーカ。

(12) 上記(1)若しくは(2)の遺伝子、又は上記(3)の組換えベクターを植物に導入し、その植物をガラクトース含有培地にて培養し、ガラクトース耐性の有無を指標に前記遺伝子が導入された植物として選抜することを含む、形質転換植物の選抜方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】

【発明の実施の形態】

1. 遺伝子のクローニング

(1) cDNAライブラリーの作製及びスクリーニング

本発明の塩ストレス耐性を付与する遺伝子は、例えば以下のようにして取得することができる、まず、海水又は塩ストレスを加えた状態(塩処理区)と加えない状態(未処理区)でそれぞれ栽培した海水耐性シバ(seashore paspalum)からトータルRNAを調製し、オリゴdTを用いて作成した一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行い、塩処理プローブと対照区プローブを作成する。

次に、これらの2種のプローブ(塩処理プローブと対照区プローブ)を用いて、seashore paspalum cDNAライブラリーからディファレンシャルスクリーニング法によって塩処理区プローブでのみ特異的に検出されるクローンを選抜する。次に、そのクローンに含まれるcDNAの部分配列を基に作成したプローブを用いてノーザン解析を行い、塩ストレスによってseashore paspalumシバでは誘導されるがイネでは誘導されないクローンを二次選抜する。最後にこのクローンをプローブとして用いて塩ストレスを加えたseashore paspalumシバから調製したcDN

Aライブラリーから目的遺伝子を含むクローンを得る。

【0011】

海水耐性シバ (Seashore Paspalum; Duedck A. E. and Peacock C. H., Agronomy Journal vol. 77, pp. 47-50 (1985)などに記述)からのmRNAの抽出及びcDNAライブラリーの作製は常法に従って行うことができる。mRNAの供給源としては、例えばSeashore Paspalumの成葉が挙げられるが、これに限定されるものではない。mRNAの調製は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、上記供給源から、グアニジウムチオシアネート-トリフルオロ酢酸セシウム法などにより全RNAを抽出した後、オリゴdT-セルロースやポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法により、あるいはバッチ法によりポリ(A)+RNA(mRNA)を得ることができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A)+RNAを分画してもよい。

【0012】

次いで、得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAからDNA合成酵素I、DNAリガーゼ及びRnaseH等を用いて二本鎖cDNAを合成する。合成した二本鎖cDNAをT4DNA合成酵素によって平滑化後、アダプター(例えば、EcoRIアダプター)の連結、リン酸化等を経て、λgt11等のベクターに組み込んでin vitroパッケージングすることによってcDNAライブラリーを作製することができる。また、λファージ以外にもプラスミドを用いてcDNAライブラリーを作製することもできる。

【0013】

上記のようにして得られる形質転換体から目的のDNAを有する株を選択するには、例えば、λファージ(λgt11等)を用いた場合は、λgt11インサート増幅用のプライマーを用いてPCRを行う方法を採用することができる。

【0014】

ここで用いられる鋳型DNAとしては、前記mRNAから逆転写反応により合成されたcDNAが挙げられる。また、プライマーとしては、市販のランダムヘキサマー等が使用できる。

【0015】

mRNAの抽出、cDNAライブラリーの作製、プローブの作製、cDNAライブラリーのディファレンシャルスクリーニングについては実施例1に具体例を示した。また、クローニングされた遺伝子がシバ (paspalum) で塩ストレス処理により誘導されることは、発現解析手法であるノーザンブロット解析法又はRT-PCR法などにより確認することができる。その確認については、実施例3に具体例を示した。

【0016】

(2) 塩基配列の決定

上記で得られたcDNAのクローンについて、PCR産物を鋳型にしてcDNAの塩基配列を決定する。塩基配列の決定はマキシム-ギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定装置（例えばApplied Biosystems社製ABI373シーケンサー、同社310 DNAシーケンサー等）を用いて配列決定が行われる。得られた塩基配列を、DNASIS（日立ソフトウェアエンジニアリング社）等のDNA解析ソフトによって解析し、得られたDNA鎖中にコードされているタンパク質コード部分を見出すことができる。

【0017】

配列番号1に、本発明の塩ストレス耐性を付与する遺伝子（以下、Ps UGE遺伝子ともいう）の塩基配列を、配列番号2に本発明のPs UGE遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるタンパク質がUDPグルコース4-エピメラーゼ活性を有する限り、そのアミノ酸配列において複数個、好ましくは1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。

【0018】

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号2で表わされるアミノ酸配列に1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

また、配列番号2に記載のアミノ酸配列と65%以上の相同性を有するタンパク

質をコードする遺伝子であって、UDPグルコース 4-エピメラーゼ活性を有するタンパク質もまた本発明の範囲に含まれる。上記65%以上の相同性は、好ましくは75%以上、より好ましくは85%以上、最も好ましくは95%以上の相同性をいう。

【0019】

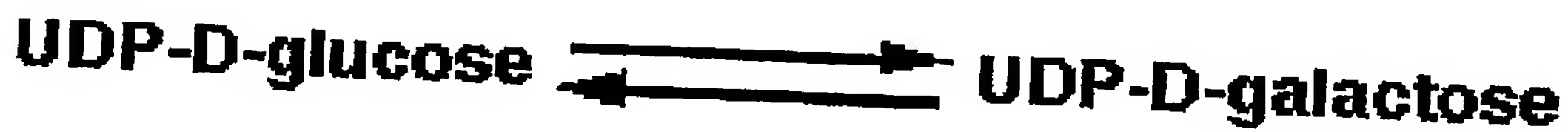
上記アミノ酸の欠失、付加、及び置換は、上記タンパク質をコードする遺伝子を、当該技術分野で公知の手法によって改変することによって行うことができる。遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法又は Gapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K(TAKARA社製) やMutant-G(TAKARA社製)）などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異が導入される。

【0020】

ここで、「UDPグルコース 4-エピメラーゼ活性」とは、UDPグルコースからUDPガラクトース、逆にUDPガラクトースからUDPグルコースの両方向の反応を触媒する活性をいい（下式参照）、UDPグルコース 4-エピメラーゼはEC 5.1.3.2で標記される。

【0021】

【化1】



【0022】

上記の「UDPグルコース 4-エピメラーゼ活性を有する」とは、上記反応の触媒活性が、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質が有する活性と実質的に同等であることをいう。

【0023】

本発明の遺伝子はまた、配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつUDPグルコース 4-エピメラーゼ活性を有するタンパク質をコードする

DNAを含む。ここで、ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、相同性が高い核酸、すなわち配列番号1で表わされる塩基配列と約65%以上、好ましくは約75%以上、より好ましくは約85%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAの相補鎖がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム濃度が150~900mM、好ましくは600~900mMであり、温度が60~68℃、好ましくは65℃での条件をいう。

【0024】

いったん本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はクローニングされたcDNAを鋳型としたPCRによって、あるいはその塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって取得することができる。さらに部位特異的誘発等によって前記遺伝子をコードする修飾されたDNAを合成することができる。

【0025】

2. 組換えベクター及び形質転換植物の作製

(1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、本発明の上記遺伝子を適当なベクターに挿入することによって作成できる。本発明の遺伝子を植物細胞へ導入し、発現させるためのベクターとしては、pBI系のベクター、pUC系のベクター、pTRA系のベクターが好適に用いられる。pBI系及びpTRA系のベクターは、アグロバクテリウムを介して植物に目的遺伝子を導入することができる。pBI系のバイナリーベクター又は中間ベクター系が好適に用いられ、例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3等が挙げられる。pUC系のベクターは、植物に遺伝子を直接導入することができる、例えば、pUC18、pUC19、pUC9等が挙げられる。また、カルフラワーモザイクウイルス (CaMV)、インゲンマメモザイクウイルス (BGMV)、タバコモザイクウイルス (TMV) 等の植物ウイルスベクターも用いることができる。

【0026】

ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制

限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

【0027】

本発明の遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、ベクターには、プロモーター、Ps UGE遺伝子のほか、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、5'-UTR配列などを連結することができる。なお、通常であれば選択マーカーとして、例えばハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が必要であるが、本発明においては目的とするPs UGE遺伝子が導入されたクローンはガラクトース含有培地における生育性を指標に選抜できるので選択マーカーは必ずしも必要としない。

【0028】

「プロモーター」としては、植物細胞において機能し、植物の特定の組織内あるいは特定の発育段階において発現を導くことのできるDNAであれば、植物由来のものでなくてもよい。具体例としては、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター (Pnos)、トウモロコシ由来ユビキチンプロモーター、イネ由来のアクチンプロモーター、タバコ由来PRタンパク質プロモーター等が挙げられる。

【0029】

「ターミネーター」は、前記プロモーターにより転写された遺伝子の転写を集結できる配列であればよい。具体例としては、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター (Tnos)、カリフラワーモザイクウイルスポリAターミネーター等が挙げられる。

【0030】

「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ、例えばCaMV35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が好適である。

【0031】

(2) 形質転換植物の作製

本発明の形質転換植物は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子 (Ps UGE遺

伝子) が自己の遺伝子中に組み込まれ、発現し得るように植物中に導入することにより得ることができる。

【0032】

本発明において形質転換に用いられる植物としては単子葉植物、例えばイネ科(イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ、シバ、ソルガム、アワ、ヒエ等)、ユリ科(アスパラガス、ユリ、タマネギ、ニラ、カタクリ等)、ショウガ科(ショウガ、ミョウガ、ウコン等)に属する植物が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0033】

本発明において形質転換の対象となる植物は、植物体全体、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、種子等)、植物組織(例えば表皮、篩部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織等)又は植物培養細胞のいずれをも意味するものである。植物培養細胞を対象とする場合において、得られた形質転換細胞から形質転換体を再生させるためには既知の組織培養法により器官又は個体を再生させればよい。

【0034】

本発明の遺伝子又は組換えベクターを植物中に導入する方法としては、アグロバクテリウム法、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法等が挙げられる。例えばアグロバクテリウム法を用いる場合は、プロトプラストを用いる場合と組織片を用いる場合がある。プロトプラストを用いる場合は、Tiプラスミドをもつアグロバクテリウムと共存培養する方法、スフェロプラスト化したアグロバクテリウムと融合する方法(スフェロプラスト法)、組織片を用いる場合は、リーフディスクにより対象植物の無菌培養葉片に感染させる方法(リーフディスク法)やカルス(未分化培養細胞)に感染させる等により行うことができる。

【0035】

遺伝子が植物に組み込まれたか否かの確認は、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。例えば、形質転換植物からDNAを調製し、DNA特異的プライマーを設計してPCRを行

う。PCRを行った後は、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、SYBR Green液等により染色し、そして増幅産物を1本のバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認することができる。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応等により増幅産物を確認する方法でもよい。

【0036】

上記のようにして得られる形質転換植物は、塩ストレスに対して耐性を獲得する。従って、当該形質転換植物は、塩ストレス耐性植物として使用することができる。ここで、「塩ストレス」とは、土壤に蓄積した塩類により土壤の水分ポテンシャルが低下して植物体が水分を吸収できなくなるなど、塩類が植物体の生理機能に損傷を与えるストレスをいう。塩類には、植物に生育阻害、収量低下、枯死を引き起こすあらゆる塩が含まれ、例えば、ナトリウム塩、マグネシウム塩等が含まれる。

【0037】

塩ストレス耐性植物は、Ps UGE遺伝子が組み込まれた形質転換植物（トランスジェニック植物）を、上記塩ストレス耐性植物として使用し得る程度に育種することにより作出することができる。この場合、植物にとって上記塩ストレスが生じる条件において、生理機能に損傷を与えず、かつ成長阻害や枯死等をせずに耐性を示す植物を選抜すればよい。ストレス耐性植物としての使用開始時期は、耐性を示す植物を選抜した後であればいつでもよい。

【0038】

3. 形質転換植物選抜用マーカー及び選抜方法

本発明の遺伝子は植物に導入し、形質転換植物選抜用のマーカー遺伝子として利用できる。本発明のマーカー遺伝子は、単独で導入してもよく、発現させる他の目的遺伝子とともに導入してもよい。

【0039】

本発明のマーカー遺伝子を導入する植物としては、単子葉植物、例えばイネ科

(イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ、シバ、ソルガム、アワ、ヒエ等)、ユリ科(アスパラガス、ユリ、タマネギ、ニラ、カタクリ等)、ショウガ科(ショウガ、ミョウガ、ウコン等)に属する植物が挙げられ、これらに限定はされないが、これらの植物はカルスを形成し得るものが好ましい。

【0040】

本発明のマーカ―遺伝子の導入する対象は、根、茎、葉、種子、胚、胚珠、子房、茎頂(植物の芽の先端の生長点)、蒴、花粉等の植物組織やその切片、未分化のカルス、それを酵素処置して細胞壁を除いたプロプラスト等の植物培養細胞を含む。本発明において、植物中へのマーカ―遺伝子の導入は、通常、植物から取り出された植物組織片やカルス、プロトプラストに対して行われ、導入されたマーカ―遺伝子は植物組織の細胞中、特にその染色体に取り込まれる。

【0041】

マーカ―遺伝子を植物に導入するにあたり、マーカ―遺伝子を単独で導入する場合は、プラスミドに連結して組換えベクターを調製する。一方、マーカ―遺伝子と発現の目的遺伝子とを共に導入する場合は、マーカ―遺伝子を目的の遺伝子とともに同一のプラスミドに連結させて組換えベクターを調製する。あるいは、マーカ―遺伝子をプラスミドに連結して得られる組換えベクターと、目的遺伝子をプラスミドに連結して得られる組換えベクターとを別々に調製してもよい。別々に調製した場合は、各ベクターを宿主にコトランスフェクト(共導入)する。なお、ベクターの調製の際に目的遺伝子又はマーカ―遺伝子の上流にプロモーターを、下流にターミネーターなどを連結することもできる。プロモーターとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、アクチンプロモーター、ユビキチンプロモーター等が挙げられ、ターミネーターとしては、例えばノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター等が挙げられる。また、上記ベクターを植物に導入する方法としては、前述した各方法と同様な方法が挙げられる。

【0042】

本発明のマーカ―遺伝子を単独で植物に導入すると、ガラクトース耐性を有する個体(形質転換植物)を得ることができる。また、ベクターを植物に導入する際に、本発明の上記マーカ―遺伝子とともに、他の特性、例えば特定の細菌に対

する抗菌性、特定の薬剤に対する耐性、特定の有用物質の合成能、特定の植物ホルモンに対する感受性又は本来の植物と異なる形態的特性等を発現する遺伝子を同時にベクターに組み込んでおくと、それらの特性を共に発現した再分化個体を得ることができる。

【0043】

上記のようにしてマーカー遺伝子を導入したプロトプラスト又は植物組織からカルスを形成させ、形成したカルスを更に培養させることが好ましい。カルスの培養は、通常知られているいずれの方法によっても行うことができ、例えば無機要素、ビタミン、炭素源、エネルギー源としての糖類、植物生長調節物質（オーキシン、サイトカイニン等の植物ホルモン）等を加えて滅菌した培地中で、無菌的に採取した植物組織又はプロトプラストを培養して無定形に増殖する脱分化したカルスを形成させる（以下「カルス誘導」という）。このように形成されたカルスをオーキシン等の植物生長調節物質を含む新しい培地に移しかえて更に増殖（継代培養）させる。

【0044】

カルス誘導は寒天等の固体培地で行い、継代培養は例えば液体培養で行うと、それぞれの培養を効率良くかつ大量に行うことができる。次に、上記の継代培養により増殖したカルスを適当な条件下で培養することにより器官の再分化を誘導し（以下、「再分化誘導」という）、最終的に完全な植物体を再生させる。再分化誘導は、培地におけるオーキシンやサイトカイニン等の植物生長調節物質、炭素源等の各種成分の種類や量、光、温度等を適切に設定することにより行うことができる。かかる再分化誘導により、不定胚、不定根、不定芽、不定茎葉等が形成され、更に完全な植物体へと生長する。

【0045】

本発明において、形質転換植物の選抜方法は、本発明の遺伝子又は組換えベクターを植物に導入し、その植物をガラクトース含有培地にて培養し、ガラクトース耐性の有無を指標に前記遺伝子が導入された植物として選抜することにより行う。ここで、「培養」とは、上記の「カルス誘導」、「再分化誘導」、「完全な植物体への成長（発根、発芽、茎伸長）」の各段階における培養の全てを含む。

遺伝子が植物に導入されたか否かはガラクトースの存在下で上記培養を行い、ガラクトース耐性の有無を指標に判断することができ、ガラクトース耐性を有するものを遺伝子が植物に導入された植物として選抜する。「ガラクトース耐性を有する」とは、カルス誘導、再分化誘導、植物体への生長（発根、発芽、茎成長など）がガラクトースに阻害されることなく正常に起こることをいう。

【0046】

以上のようにして選抜された植物体は、植物組織培養において通常採用されている方法により完全な植物体に育成してもよく、又は完全な植物体になる前の状態（例えばカプセル化された人工種子、乾燥胚、凍結乾燥細胞及び組織等）で貯蔵等を行ってもよい。

【0047】

上記のようにして選抜されたカルス又は植物体にはPs UGE遺伝子、又はPs UGE遺伝子と目的遺伝子の両者が組込まれている。従って、これら遺伝子が存在することの確認はPCRなどにより、遺伝子が発現したことの確認はRT-PCRなどによりそれぞれ行うことができる。

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記の実施例により限定されるものではない。

（実施例1） 塩ストレス下誘導シバ遺伝子のクローニング

一般的なRNA及びDNAの実験方法は、Molecular cloning-a laboratory manual-second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York (1989)に従いこれを常法とした。また、実験中に使用したキットの使用方法はメーカーの示すプロトコールに従った。

【0048】

(1) 植物材料の調製

Seashore Papalumシバ (Duedck A. E. and Peacock C. H., Agronomy Journal vol. 77, 47-50 (1985))を砂の入った1/5000a ワグネルポットに植え付け、東京湾から採水した塩分濃度2.3~2.7%の海水で灌水し、温室内で3~6ヶ月間栽培した。毎日一回、海水をポット上面からかけて、ワグネルポットの排水口より

海水がしみ出るまで灌水を行った。この海水灌水処理により、最低 5 年間この *Seashore Papalum* は生育維持し、海水耐性を示した。

【 0 0 4 9 】

この材料の分枝より、第 1 葉から第 3 葉、茎、及び節を含む切片（図 1）を採取し、砂へ挿し芽を行い、発根させてクローン苗を温室内にて育成した。このクローン苗を以下の海水ストレスまたは水耕による塩ストレス実験に使用した。

【 0 0 5 0 】

海水ストレスは以下の通りに与えた。まず、育成した苗を 1/5000a ワグネルポット（作土壌深 15cm）で、水道水にて温室内で 4 ヶ月通常栽培した。土壌は、イネ用培土と赤玉を 1：1 に混合したものを用いた。苗がポット栽培で順調に生育した段階（植え付け 4 ヶ月後）で、上記の方法で海水灌水処理を開始した。

【 0 0 5 1 】

対照区となる材料は、海水灌水処理を開始する前（水道水栽培）にサンプリングし、 -80°C に保存した。塩ストレス条件の材料は、海水灌水処理 14 日でサンプリングし、 -80°C に保存した。サンプリング部位は地上部の葉とした。後述（3）のディファンレンシャルスクリーニング用の cDNA ライブラリーおよびプローブ作成のための RNA は、この海水栽培した材料から抽出した。

【 0 0 5 2 】

水耕による塩ストレス実験は以下のようにして行った。まず、上述の水道水栽培したクローン苗より、図 1 に示した切片を採取して水耕（蒸留水）で、挿し芽を行った。これを明期（照度 5000 lx、温度 30°C ）16 時間、暗期（照度：0 lx、温度 22°C ）8 時間の条件で、植物育成装置（トミー製、Cultivation Chamber、CU-251）にて 1 週間育成し発根させた。発根後、蒸留水を下記表 1 に示す改変・吉田水耕培地（S. Yoshida, et al., Laboratory Manual For Physiological Studies of Rice 3rd. Ed., The International Rice Research Institute, pp.61-66 (1976); 微量元素は D.R. Hoagland & Arnon, D.I., Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Circ., p.347 (1936)、鉄分は、Murashige T. & Skoog F., Physiologia Plant., pp.473-497 (1962) の FeEDTA に改変）に置き換え、更に 1 週間、明期（照度 10000 lx、温度 30°C ）16 時間、暗期（照度：0 lx、温度 22°C ）8

時間の条件で育成した。

【0053】

育成後、塩ストレスを4週間与えた。塩ストレスの条件は上述の改変・吉田水耕培地に500mMのNaClを添加したものをを用いた。塩ストレスを与えて4週間後に地上部の葉を採取した。後記(4)のノーザン解析および後記(5)の全長cDNA単離のためのcDNAライブラリーは水耕した切片より抽出したRNAを使用した。

【0054】

【表1】

改変・吉田水耕培地

成分名	化合物名	濃度 (mg/L)
窒素	NH_4NO_3	11.425
リン酸	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50.375
カリウム	K_2SO_4	89.25
カルシウム	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	146.625
マグネシウム	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	405
鉄 (Fe EDTA)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.964
	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	13.36
微量元素	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.213
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22
	H_3BO_4	2.875
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.21
緩衝液	MES	2137

【0055】

尚、上記水耕培地は5N NaOHを用いてpH5.5に調整した。2日ごとに水耕液の体積を調べ、体積が減ったら、蒸留水を加えて初期の体積（ワグネルポットの場合、4L）に戻した。また、2週間に1回、水耕液を新鮮なものと交換した。

【0056】

(2) RNAの調製とcDNAライブラリーの構築

生重量で2gの葉からトータルRNA約1mgをRneasy Mini Kit (キアゲン社製)、又はChang, S. ら(1993)の方法 (Plant Mol. Biol. Report, 11, pp.113-116) を用いて抽出した。両法の場合ともに、Dnase I (タカラバイオ社製、Rnaseフリー、5 mM MgSO₄存在下、25℃、11時間) 処理を追加した。さらに、トータルRNAからBioMag SelectaPure, mRNA Purification System (Polysciences, Inc. 社製) を用いてmRNAを10 μ g精製した。このmRNA 5 μ gからオリゴ(dT)₁₂₋₁₈によりTime Saver cDNA合成キット (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて1st strand cDNAさらに2nd strand cDNAを合成した。次に、cDNAをクローニングするためDirectional Cloning Kit (アマシャムバイオサイエンス社製) を用い、 λ gt11のファージ用ベクターへ挿入したものを、Ready-To-Go Lambda Packaging Kit (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いてパッケージングを行った。E. coli Y1088 を宿主として、タイターチェックの後、ディファレンシャルスクリーニングに供した。

【0057】

(3) プロープの調製とディファレンシャルスクリーニング

上述のSeashore Paspalum シバを水道水栽培で挿し芽の状態から4ヶ月育成したもの(対照区)と4ヶ月育成後から海水を灌水しつづけて2週間経過したもの(塩処理区)から、それぞれトータルRNAをそれぞれ調製し、オリゴ(dT)₁₂₋₁₈によりTime Saver cDNA合成キット (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて1st strand cDNAを作成した。この1st strand cDNAを鋳型として、同キットに添付されているランダムヘキサマー (pdN₆) を用い、PCRを行った (PCR条件: Premix ExTaq (タカラバイオ社製) を用いてcDNAを94℃ 5分熱変性、(94℃30秒、55℃1分、72℃1分) ×25サイクル、72℃1分、Gene Amp PCRシステム9600を使用)。得られたPCR産物をゲル電気泳動で確認の後、ECL direct labeling kit (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて2種類のプロープ (対照区と塩処理区) を作成した。

【0058】

cDNAライブラリーを直径14.5cmのシャーレに撒き、2000プラークからディファ

レンシヤルスクリーニングした。Hybond N (アマシャムバイオサイエンス社製) を使用してブランクプロットティングを行い、ブランクのシグナルの検出にはECL detection system (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いた。上述の2種類のプローブで1枚のシートをそれぞれ検出し、塩処理区プローブで検出されるが、対照区プローブでは検出されないブランクを塩処理区で特異的なものとして選抜した。

【0059】

選抜したクローンのインサート領域をプラスミドベクターへ移すため、ファージDNAを抽出した。ファージDNAを94℃10分処理して、急冷したものを鋳型とし、λgt11のフォワードプライマー (5'-GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC CCG-3':配列番号3) とリバースプライマー (5'-TTG ACA CCA GAC CAA CTG GTA ATG-3':配列番号4) (タカラバイオ社製) を用いてPremix ExTaq (タカラバイオ社製) でPCRを行った (95℃1分、(94℃1分、55℃2分、72℃2分) ×25サイクル、72℃2分)。得られたPCR産物をpT7 Blue T-ベクターへPerfectly Blunt Cloning Kit (Novagen社製) を用いてサブクローニングした。選抜された複数個のクローンをdRhodamine dye-terminator法 (AmpliTaq DNA polymerase FS; Applied Biosystems社製) によりシーケンス反応を行った後、ABI 310ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems社製) を用いて両鎖方向からDNA配列を決定した。

【0060】

(4) ノーザン解析による第二次スクリーニング (イネとの比較)

得られた2クローン (Ps ABAとPs uge) から二次選抜用プローブを作成した。Ps ABAプローブは、pT7 Blue T-ベクターのクローニングサイトを制限酵素EcoRI (タカラバイオ社製) とpoly Aを含まないようにインサート内部を制限酵素Alu I (New England Biolab社製) で切断し、アガロース電気泳動により切り出すことによって調製した (配列番号5)。また、Ps UGEプローブは、最初のデイファレンシヤルでとれたcDNAクローンPs uge (配列番号6) をpT7 Blue T-ベクターにサブクローニングし、インサート内部にあるNot IサイトとSca I サイトで切り出すことによって調製した (配列番号7)。

【0061】

Ps ABAプローブ (配列番号 5)

TGCCGTGGGCTCCGGCGGGTTCGCCTTCCACGAGCACCACGAGAAGAAGGAGGACCACAAGGACGCCGAGGA
GGCCGGCGGCGAGAAGAAGCACCCTTCTTCGGCTGATCCATCTCACCATCTCCATCTCCCACCCCATCGA
TCCATTTGTGTTGGCTTTAATTCCCTGCGTGCATGCGTGTTGTTGAATAAGGGGCCGGTTCATCTGTACGT
ACGTGTACTCCGAGACCTATCGTCATGTGTGTGTGTGTACGTATACCTGCTGTGTACATGATGGTCGTATAT
GCCACTGGACTATGTGTGTGTGCAACTCTGTTCTGATTTGCTATATATAAG

【0062】

最初のディファレンシャルでとれたcDNAクローンPs uge (配列番号 6)

TGCAGGGACCAGTGGAAGTGGGCCAAGAAGAACCCTATGGCTACTGCGGCACTGCCGAAAAATAGAGCGCG
TGCATTAATCAGATCTCTGGACTGAATTTGTCCATGGTTGATGGTTGTCTCAGACCTATCGGTGGAAGATGT
AACAAGTAGAGACCGCTCGAATGTGCCTAGCTACGAAGTTTCGTACCATCTCTCTTGTGCATAACCTCATGTA
GATGGTCATTTTATTGGAATTAGCCTTAGCCTTCAGGCCCGGCGCTGTAAAATTTGTTTTACACATGGATT
TTCTCGCTACGTGTGATACATATTGTGTCTGTAATAATCCTGATCGGAGTTTCCAGTAATAAAACCGATCCA
CGACGGTGGCTACGCCCTGTGTTGTAGTactgtgaatatgatgtggttaataacaataacttgcagtgagact
tcagctttcaa

【0063】

Ps UGEプローブ (配列番号 7)

GGCCGCTGTGCAGGGACCAGTGGAAGTGGGCCAAGAAGAACCCTATGGCTACTGCGGCACTGCCGAAAAAT
AGAGCGCGTGCATTAATCAGATCTCTGGACTGAATTTGTCCATGGTTGATGGTTGTCTCAGACCTATCGGTG
GAAGATGTAACAAGTAGAGACCGCTCGAATGTGCCTAGCTACGAAGTTTCGTACCATCTCTCTTGTGCATAAC
CTCATGTAGATGGTCATTTTATTGGAATTAGCCTTAGCCTTCAGGCCCGGCGCTGTAAAATTTGTTTTACA
CATGGATTTTCTCGCTACGTGTGATACATATTGTGTCTGTAATAATCCTGATCGGAGTTTCCAGTAATAAAA
CCGATCCACGACGGTGGCTACGCCCTGTGTTGTAGT

【0064】

調製したPs ABAプローブ及びPs UGEプローブを用いてPaspalumシバとイネ (品種ポッカリ) での遺伝子発現の塩誘導性の比較を行い、Paspalumシバでは発現が塩ストレスにより誘導されるが、イネでは誘導されないクローンを第二次選抜した。イネ (ポッカリ) は上述の改変・吉田水耕培地で育成し、対照区 (0mM NaCl) と塩処理区 (50 mM NaCl) での1ヶ月後の茎葉部からトータルRNAを抽出した。

トータルRNAの電気泳動、ノーザンブロッティング及びハイブリダイゼーションを常法に従って行った。

【0065】

Ps ABAプローブによるノーザン解析では、*Paspalum*とイネのいずれのトータルRNAにもPs ABA で検出されるmRNAが発現し、塩誘導性もあることが確認された(図2(A))。よって、このPs ABAクローンは耐塩性の低いイネにもホモログが発現しているとして選抜しなかった。一方、Ps UGEプローブによるノーザン解析では、Ps UGEは*Paspalum*シバで塩誘導性が認められたが、イネ(ポッカリ)で発現が認められなかった(図2(B))。従って、このPs UGEクローンを*Paspalum*シバ特異的なクローンとして選抜した。Ps UGEプローブのDNA配列をBlast Xによるホモロジー検索を行った結果、Guar (*Cmopsis tetragonoloba*)の遺伝子 (Accession No. AJ005081, Joersbo, M., et al., Plant Science 142, pp. 147-154, 1999)、及びシロイヌナズナの遺伝子 (Dormann, P. & Benning, C., Archives of Biochemistry and Biophysics, 327, pp.27-34, 1996)とホモロジー性のあることが判明した。このPs UGEクローンを全長cDNA単離用のプローブとして利用した。

【0066】

(5) 全長cDNAの単離と配列決定

吉田・水耕培地により塩ストレス (400mM NaCl) を1週間与えた*Paspalum*シバよりmRNA10 μ gを取得し、ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning kit (Stratagene社製) を用いて、cDNA合成、Zap Express ベクターへのクローニング、及びパッケージングを行った。cDNAライブラリーを14 \times 9 cmの角形シャーレ10枚に撒き、約100,000プラークから選抜を行った。Hybond N (アマシャムバイオサイエンス社製) を使用したプラークブロッティングを行い、前記(4)でノーザン解析に使用したPs UGEプローブをECL direct labeling kit (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて標識し、プラークのシグナルの検出にはECL detection system (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いた。1~3次スクリーニングの結果、PS UGEプローブで検出されるプラークを3つ単離した。In vivo excisionにより、それぞれのcDNAをpBK-CMV phagemid vector (Stratagene社製)

に移した。選抜された3個のcDNAをdRhodamine dye-terminator法 (AmpliTaQ DN A polymerase FS : Applied Biosystems社製)によりシーケンス反応を行った後、ABI 310ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems社製)を用いて両鎖方向からDNA配列を決定した。シーケンスにはT7 とT3のプライマー、及び各cDNAに特異的なプライマーを用いた。配列の解析は、Genentyx Mac.Ver.11 (Software Development Co. LTD, 2000)を用いた。

【 0 0 6 7 】

シーケンスの結果、Ps UGEの配列とほぼ一致するcDNAクローン (Ps UGE1) が得られた。Ps UGE1の塩基配列を配列番号1に、それよりコードされるアミノ酸配列を配列番号2に示す。また、Ps UGE1とアミノ酸レベルで65%のホモロジーを有するcDNAクローン (Ps UGE2) が得られた。Ps UGE2の塩基配列を配列番号8に、それよりコードされるアミノ酸配列を配列番号9に示す。

【 0 0 6 8 】

(6)他種由来のUGEホモログとの比較

これまでにEST及びゲノム解析から登録されている植物UGEホモログとPs UGE1及びPs UGE2との系統樹を作成した (図3 ; シロイヌナズナのUGEファミリーAtlg30620、Atlg12780、Atlg63180、Atlg64440、At2g34850、At4g10960、At4g23920とイネOs UGE (Accession No. AB087745)、グアCt UGE (Accession No. AJ005081) を使用)。これによるとPs UGE1はグループNo.1に分類された。グループNo.1に分類されたホモログ及びPs UGE2のアミノ酸配列でアラインメントをかけた結果を図4に示す。同じグループNo.1のいわゆるオルソログと考えられるシロイヌナズナのUGE遺伝子、及び同じPaspalum由来のPs UGE2と比較してPs UGE1はN末端のアミノ酸が約10塩基ほど長い新規の特徴を有していた (図4)。

【 0 0 6 9 】

(実施例2) 植物用発現ベクターの作成

実施例1で得られたPs UGEの全長cDNAを植物遺伝子導入用の発現ベクターへ以下のようにして導入した。まず、3'側のpoly Aを除くため、上述のクローンPS UGE1を鋳型に、インサート上流側45bp~64bp番目の配列：5'-ACAGAGCCGCAAACC ACAC-3' (配列番号10) をセンスプライマー、下流側1314bp~1340bp番目の配

列: 5'-TTCGTAGCTAGGCACATTCGAGCGGTC-3' (配列番号 11) をアンチセンスプライマーとし、酵素Pyrobest (タカラバイオ社製) を使用し、98℃ 2分、(96℃ 30秒、62℃ 30秒、72℃ 2分) × 30サイクル、72℃ 3分の条件でPCRを行った。増幅されたDNA断片 (約1.3kb) をアガロースゲル電気泳動で分離して切り出し、ゲル抽出キット (キアゲン社製) を用いて精製した。この断片をPCR-Script Amp Cloning Kit (Stratagene社製) を用い、pCR-Script Amp SK(+) にクローニングし、シーケンスを行い、配列を確認した。この1.3kb断片をインサートとして持つpCR-Script Amp SK(+) のクローンをPs UGE1aとした。

【0070】

Ps UGE1aを制限酵素Not I (東洋紡社製) で処理してエタノール沈澱した後、タカラバイオ社製のブランディングキットを用いて平滑末端化し、フェノール抽出により精製した。さらにこの断片をBam HI (東洋紡社製) で処理し、切り出されるPS UGE遺伝子断片 (約1.3kb) を0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キット (キアゲン社製) を用いて精製した。

【0071】

本遺伝子断片をプロモーターとターミネーターの間に挿入するため、pBI221 (クロンテック社製) を制限酵素Sac I (東洋紡社製) で処理し、エタノール沈澱した。次いで、タカラバイオ社製のブランディングキットを用いてSac I切断部位を平滑末端化し、フェノール抽出により精製した。この断片を更にBam HI (東洋紡社製) で処理し、ベクター部分とGUS部分を0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キット (キアゲン社製) を用いてベクター断片を精製した。その後、タカラバイオ社製のライゲーションキットver. Iを用いて、このベクター部分とPs UGE遺伝子断片 (約1.3kb) のライゲーション反応を行い、大腸菌JM109への形質転換の後、プロモーター部分に対してセンス方向にPs UGE遺伝子断片 (約1.3kb) が挿入したクローンを選抜した。これをPs UGE1a/pBI221とした。以上の構築手順を図5に示す。

【0072】

このPs UGE1a/pBI221の発現カセット部分を遺伝子導入用のバイナリーベクターに挿入するため、以下の操作を行った。Ps UGE1a/pBI221を制限酵素EcoRI (東

洋紡社製)で処理してエタノール沈澱した後、タカラバイオ社製のブランディングキットを用いて平滑末端化し、フェノール抽出により精製した。さらにこのDNAを制限酵素Hind III (東洋紡社製)処理し、エタノール沈澱した後、さらにDraIII (New England Biolab製)処理し、発現カセット部分35S:Ps UGE:nos T (約2.5 kb)とベクター部分を0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キット (キアゲン社製)を用いて発現カセット部分を精製した。次にベクターpIG121Hm (Plant Cell Report, Vol. 12, pp.7-11 (1992)、名古屋大学 中村研三氏より入手)を制限酵素Sal I (東洋紡社製)処理してエタノール沈澱した。次いで、タカラバイオ社製のブランディングキットを用いてSal I切断部位を平滑末端化し、フェノール抽出により精製した。このプラスミドベクター断片を更にHind III (東洋紡社製)で処理し、ベクター部分と35S:Intron-GUS:nos Tを0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キット (キアゲン社製)を用いてベクター断片を精製した。その後、タカラバイオ社製のライゲーションキットver.Iを用いて、Ps UGE遺伝子発現カセット断片とベクター断片のライゲーション反応を行い、プラスミドベクターpIG121Hmの35S:Intron-GUS:nos T部分に、Ps UGE遺伝子発現カセット断片が挿入したクローンを選抜し、Ps UGE1a/pBI121Hmとした。

【0073】

このPs UGE1a/pBI121HmをBam HI (東洋紡製)処理し、エタノール沈澱した後、タカラバイオ社製のブランディングキットを用いて平滑末端化し、フェノール抽出により精製した。さらにこの断片をHind III処理して、Ps UGE1a発現カセット+35S:HPT遺伝子のDNA断片を0.7%のアガロース電気泳動により切り出してキアゲン社製のゲル抽出キットにより精製した。pBI221 (クロンテック社製)を制限酵素Sac I (東洋紡製)で処理し、エタノール沈澱した後、タカラバイオ社製のブランディングキットを用いて平滑末端化し、フェノール抽出により精製した。さらにこの断片をHind III (東洋紡製)で処理し、ベクター部分と35S:GUS部分を0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キット (キアゲン社製)を用いてベクター断片を精製した。タカラバイオ社製のライゲーションキットver.Iを用いて、このベクター部分とPs UGE1a発現カセット+35S:HPT遺伝子との

ライゲーション反応を行い、大腸菌JM109への形質転換の後、プロモーター部分に対してセンス方向にPs UGE遺伝子断片（約1.3 kb）が挿入したクローンを選抜した。これをPs UGE1a/pBI221Hmとした。

【0074】

pIG121HmをSal IとBam HI処理して（東洋紡製）、ベクター部分と35S:HPT遺伝子部分を0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、35S:HPT遺伝子部分を切り出してキアゲン社製のゲル抽出キットにより精製した。これを更に、タカラバイオ社製のブランディングキットを用いて平滑末端化した。次にpBI221をHindIIIとSac I処理し、0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キット（キアゲン社製）をもちいてベクター断片を精製した。このベクター部分をさらに宝バイオ社製のブランディングキットを用いて平滑末端化し、タカラバイオ社製のライゲーションキットver.Iを用いて、このベクター部分と上述の35S:HPT遺伝子部分とを連結した。そして、大腸菌JM109への形質転換の後、35Sプロモーター:HPT遺伝子:Nosターミネーターの順序に連結されたものを選びHPT/pBI221とした。これはPs UGE1a/pBI221とのコトランスフォーメーションに使用した。

【0075】

（実施例3） 形質転換体の作製及び導入遺伝子の確認

（1）Ps UGE形質転換イネの作製

イネ（品種：日本晴、滋賀県農協より種籾を入手可能）の完熟種子由来の再分化能を有する液体培養系からプロトプラストを単離し供試材料とした。プロトプラストの調整およびエレクトロポレーションの方法は経塚らの方法（Kyojuka et al., Mol. Gen. Gnet., 206, pp. 408-413, 1987）、鳥山らの方法（Toriyama et al., Bio/Technology 6, pp.1072-1074）、赤木らの方法（Akagi et al., Mol. Gen. Gnet., 215, pp.501-506, 1989）等に準じて行った。

プロトプラストを 2×10^6 /mL、プラスミドDNA（Ps UGE1a/pBI121HmまたはPs UGE1a/pBI221HmまたはPs UGE1a/pBI221とHPT/pBI221のコトランスフォーメーションのいずれか）を50 μ g/mLになるように0.4Mマンニトール、70mMアスパラギン酸カリウム、5mMグルコン酸カルシウム、5mM.MESの導入バッファーに懸濁しエレクトロポレーションを行った。電気パルスは電界強度450V/cm、時定数約40msの減衰

波とした。なお導入装置には島津社製のGTE-10を、導入チャンバーにはFTC-54を使用した。

【0076】

R2P培地（伊藤紀美子、1996、植物細胞工学シリーズ、モデル植物の実験プロトコール、秀潤社、pp.82-88）を基本としたアガロース培地により包埋したプロトプラストを、液体培地を加えナース細胞と共に培養した。導入14日後ナース細胞および液体培地を除きハイグロマイシン $50\mu\text{g/mL}$ を添加したR2P培地を加え形質転換体の選抜を開始した。耐性カルスが $1\sim 2\text{mm}$ に成長後、選抜された形質転換カルスをハイグロマイシン $50\mu\text{g/mL}$ のRS2A培地（伊藤紀美子、同上）に移植した。10～14日間培養し増殖させた後、ハイグロマイシン $50\mu\text{g/mL}$ の再分化培地（西村哲と島本功、1996、植物細胞工学シリーズ、モデル植物の実験プロトコール、pp.78-81、秀潤社）にカルスを移植し、植物体を再生させた。

【0077】

再分化植物体をカルス塊からはずし、 $50\mu\text{g/L}$ ハイグロマイシンを含むホルモンフリー培地（西村と島本、同上）に置床し、発根してくる個体を選抜し、シャーレの蓋を開けて滅菌水をシャーレの培地上に注ぎ、1週間馴化を行った。この時、培地が乾かないように2日に1回滅菌水を供給した。馴化後、選抜された植物体（日本晴To世代とする）をイネ育成用土壌（三菱化学製）：赤玉（1：1）を入れたジフィーポット（縦×横×高さ： $5\text{cm}\times 5\text{cm}\times 6\text{cm}$ ）に植え付け、1～2ヶ月後にプラスチック製のポット（幅×奥行き×高さ： $15\text{cm}\times 5.5\text{cm}\times 9.5\text{cm}$ ）へ移植してさらに4～10ヶ月育成し、自殖又は交配し、種子を得た。育成は隔離温室にて行った。

【0078】

(2) Ps UGE遺伝子導入及び発現の確認

形質転換イネからのゲノムDNAの抽出は、若葉を $1\sim 3\text{cm}$ の長さに切り、滅菌したエッペンドルフチューブに入れ、 $100\mu\text{L}$ のTE緩衝液（ 10mM Tris HCl、 $\text{pH}8.0$ 、 1mM EDTA）を更に添加し、エッペンドルフチューブ用のホモジェナイザーで1～3分磨砕することによって行った。磨砕後は氷上に保管し、 4°C 、 $15,000\text{rpm}$ で2分間遠心し、上清を新しい滅菌チューブに移した。この上清をゲノムDNA画

分とした。

【0079】

Ps UGE遺伝子の存在を確認するために、ゲノムPCRを5'-GTC GTC GAC AAC TTC CAC AA-3' (配列番号12) をセンスプライマー、5'-TTG TTC TCG TAG TAC ATG TC-3' (配列番号13) をアンチセンスプライマーとし、1.25Uの酵素KOD-Dash (東洋紡社製)、10pmolesのプライマー、0.2mMのdNTP、反应用緩衝液 (終濃度: 20mM Tris-HCl (pH7.5)、8mM MgCl₂、7.5mM DTT、2.5 μ g/50 μ L BSA) を用いて行った。上述したゲノムDNAは20 μ LのPCR反応液全量に対して10 μ Lを使用した。反応装置は、ABI社製のGene Amp PCRシステム9600又はGene Amp PCRシステム9700を使用し、PCR条件は98℃ 2分、(98℃30秒、55℃ 2秒、74℃30秒) \times 30サイクル、74℃ 5分、4℃で保持とした。

【0080】

上記ゲノムPCRの結果を図6に示す。図6に示すように、配列番号12をセンスプライマー、配列番号13をアンチセンスプライマーとして増幅させた226bpの断片 (レーン1: ベクターDNA) はPs UGE形質転換日本晴 (レーン3) でのみ検出され、非組換え体のイネ品種 (日本晴 (レーン2、4)、コシヒカリ (レーン6)、IR28 (レーン5)、ポッカリ (レーン7)) ではいずれも検出されず、形質転換体の確認に適していることを示している。また、図7は、Ps UGE形質転換日本晴To世代 (遺伝子導入し、選抜した個体)、該To世代とコシヒカリの交配F1世代を用いて同じくゲノムPCRを行った結果を示す。図7において矢印はPs UGE遺伝子の内部配列226bpに対応するバンドの位置を示す。Vは発現ベクター Ps UGEla/pBI221を鋳型とした場合のPCR産物、NTは非組み換えイネのゲノムPCR産物である。図7 (上段) に示されるように、ハイグロマイシン耐性To世代22個体のうち20個体にPs UGE遺伝子の存在を示すバンドが確認された。日本晴To世代と非形質転換コシヒカリとの交配によって得たF1については、図7 (下段) は46個体中29個体のゲノムにPs UGE遺伝子の存在が確認された例を示している。最終的には120個体のハイグロマイシン耐性イネTo世代のうち、106個体にPs UGE遺伝子を示すバンドが確認された。また、全体で193個体のF1世代のうち、90個体のゲノムにPs UGE遺伝子の存在が確認された。

【 0 0 8 1 】

Ps UGE形質転換日本晴To世代におけるPs UGE導入遺伝子の転写を確認するために、RT-PCRを配列番号 1 2 (同上) をセンスプライマー、配列番号 1 3 (同上) をアンチセンスプライマーとし、1.25Uの酵素KOD-Dash (東洋紡社製)、10pmole sのプライマー、0.2mMのdNTP、反应用緩衝液 (終濃度: 20mM Tris-HCl (pH7.5)、8 mM MgCl₂、7.5 mM DTT、2.5 μ g/50 μ L BSA) を用いて行った。上述したトータルRNAより1st strand cDNA合成キット (Life Science社製) を用いて作成した1st strand cDNAを20 μ LのPCR反応液全量に対して0.2~10 μ Lを使用した。反応装置は、ABI社製のGene Amp PCRシステム9600又はGene Amp PCRシステム9700を使用し、PCR条件は98℃ 2分、(98℃30秒、55℃ 2秒、74℃30秒) ×30サイクル、74℃ 5分、4℃で保持とした。

【 0 0 8 2 】

上記RT-PCRの結果を図 8 に示す。図 8 において矢印は Ps UGE遺伝子の内部配列226bpに対応するバンドの位置を示す。Vは発現ベクター Ps UGE1a/pBI221を鋳型とした場合のPCR産物であり、NTは非組み換えイネの1st strand cDNAを鋳型とした場合のRT-PCR産物である。図 8 に示されるように、cDNAを鋳型とした場合、22個体のハイグロマイシン耐性イネ (To世代) のうち20個体にPs UGE遺伝子の転写を示すバンドが確認された。1st strand cDNA合成に用いたトータルRNAに対してはバンドが検出されず、このバンドがゲノムDNA由来のものではないことを示している。このようにしてRT-PCRを実施した結果、Ps UGE1をゲノムに有する106個体のハイグロマイシン耐性イネ (To世代) のうち、95個体の日本晴To世代がPs UGEを発現し、さらに、ゲノムにPs UGEを有する90個体のF1のうち、81個体のF1世代 (日本晴To世代とコシヒカリを交配した植物体) にPs UGE遺伝子の発現を確認した。

【 0 0 8 3 】

(実施例 4) Ps UGE形質転換イネ個体のガラクトース耐性の確認

実施例 3 で得られたPs UGE形質転換イネ (35S:Ps UGE1a:nosT)、コントロールとして非形質転換イネ (日本晴) カルスからの再分化個体を用いて発根に対するガラクトースの影響とPs UGEの効果調べた。培養は、抗生物質の入っていない

検定培地MSHF（横井修司ら、同上）のシュクロースを0mMとし、ガラクトース濃度をそれぞれ21mM、42mM、84mM、168mMとした培地、あるいはグルコース濃度を同じく21mM、42mM、84mM、168mMとした培地で、16時間日長、10000 lxで1～2週間行った。培養結果を図9に示す。非形質転換イネカルス再分化個体では、グルコースの濃度系列において発根がシュクロースとほぼ同等に起こるが、ガラクトースの濃度系列では発根が完全に抑制された。これに対してPs UGE導入形質転換イネ（35S:Ps UGE1a:nosT）では、ガラクトースによる発根抑制がほぼ完全になくなった（図9）。図10は、Ps UGE遺伝子導入イネ（35S:Ps UGE1a:nosT）、非形質転換イネカルス再分化個体について、ガラクトース添加培地で生育させた場合の発根の写真、不定根の数、不定根の最大長（cm）を示す。また、図11は、Ps UGE遺伝子導入イネ（35S:Ps UGE1a:nosT）、非形質転換イネカルス再分化個体について、ガラクトース添加培地で生育させた場合の苗条の写真、苗条の最大長（cm）を示す。これらの図に示されるように、根の生長及び葉茎部の生長に対するガラクトースの抑制効果もPs UGE遺伝子により緩和されることが分かった。この結果から、Ps UGE遺伝子はイネ科植物の糖代謝を改変し、ガラクトースを利用して生長可能なガラクトース耐性イネ科植物を作成する機能を持つことが見い出された。

【0084】

（実施例5） Ps UGE遺伝子を導入した形質転換イネの塩ストレス耐性の評価

(1) Ps UGE遺伝子を導入した日本晴To世代における耐塩性スコア評価試験

塩ストレス耐性試験は、横浜市戸塚区に設置した隔離温室で行った。試験期間は7月～9月で、平均気温は29℃、最高気温は34℃、最低気温26℃、平均湿度70～90%であった。日長は平均14時間で照度は5万lxであった。塩ストレスは以下のようにして与えた。隔離温室内に縦0.9m、横1.5m、高さ0.15mのプラスチック製の水槽を3つ設置し、人工海水（日本動物薬品社製）を10分の1濃度に希釈したものを水深10cmの高さまで入れた。この時点のNaCl濃度は3%であり、塩分濃度計（ATAGO社製ES421）により3%であることを確認した。水分の蒸発による塩濃度の上昇を避けるため、1日に1回塩分濃度を測定し、濃度が上昇した場合は水道水を入れて3%に調整した。水槽には水流ポンプを設置して水槽内の水を循

環させ、塩濃度の偏りを抑えた。

【 0 0 8 5 】

この水槽に、実施例 3 に示した方法で馴化後から 2 ヶ月、成熟期まで育成した Ps UGE 遺伝子導入日本晴 To 世代を栽培用のポット（幅×奥行き×高さ：15cm×5.5cm×9.5cm）のまま水槽に浸漬し、10% 海水にて栽培を行った。その試験状況を図 1 2 に示す。試験に使用した To 世代の植物体数は 95 個体、対照区のカルスから再分化した非形質転換体数は 18 個体であった。これらの個体の作成は実施例 3 の方法に従って行った。各植物体を水槽に浸漬するに当たっては、水槽を縦 57cm、横 37cm に区切ってブロック化し、乱数表を用いて各個体の水槽における位置を決定した。

【 0 0 8 6 】

塩ストレス耐性の評価は、フィリピンの国際イネ研究所（IRRI）にて確立された方法で行った。10 週間目に葉の枯れ程度を目視により調査し、IRRI での方法に準じたスコアの定義（表 2）に従って、各個体毎にスコアをつけた。その結果を図 1 3 に示す。日本晴の非組換え個体集団のスコアを白のカラムで、Ps UGE 遺伝子導入 To 個体の集団を黒カラムで示した。横軸はスコアを、縦軸は各スコアを示した個体数の集団内における比率を示している。非組み換え集団と比較して、Ps UGE 遺伝子導入集団はスコアの分布が高い方向へシフトし（中央値 0.46→0.52）、スコアの中央値が高くなった。この差は χ^2 乗検定において 5 % で有意であった。以上の結果より、Ps UGE 遺伝子導入により耐塩性の向上が実証された。

【 0 0 8 7 】

【表 2】

耐塩性スコアの定義

耐塩性スコア	イネの状態
3	苗が普通の生長し、葉には枯れる兆候がない。
2	生長がわずかに減少、葉先が変色、古い葉が乾燥する。
1	生長が著しく減少、全ての葉が変色する。 古い葉は乾燥、他の葉は巻き上がる。
0.5	生長が著しく減少、全ての葉が変色、枯れかかっている。
0	苗が枯死および枯れかかっている。

【0088】

(2) Ps UGE遺伝子導入日本晴Toとコシヒカリの交配によるF1世代の塩ストレス耐性評価試験

上記(1)で耐塩性の向上したPs UGE遺伝子導入日本晴To世代と日本晴よりも更に耐塩性の低いコシヒカ리를交配させてF1世代を得た。F1種子およびその他の品種の種子をジフィーポット（縦×横×高さ：5 cm×5 cm×6 cm）に播き、2～3葉期に実施例3で示したようにゲノムPCR行い、Ps UGE遺伝子が確認されたF1集団（F1 Ps UGE+）とPs UGE遺伝子が確認されないF1集団（F1 PsUGE-）を分けた。分ける際には、ジフィーポットのセルを切り分けて、集団毎にトレイにまとめた。

【0089】

Ps UGE遺伝子が確認されたF1集団（F1 PsUGE+）について、Ps UGE遺伝子が確認されないF1集団（F1 PsUGE-）、非形質転換イネ（品種名：日本晴、コシヒカリ、IR28）を対照として耐塩性試験を行った。塩ストレスは、2～3葉期の状態のイネに対して与え、ジフィーポットのまま水槽へ浸漬させる点を除いては、前記(1)と同じ条件にて行った。また、試験期間は12月～2月で、平均気温は28℃、最高気温は32℃、最低気温24℃、平均湿度60～80%であった。日長は平均9時間で照度は5千から1万lxであった。

【0090】

上記試験結果を図14に示す。2週間目よりPs UGE遺伝子導入イネの集団は対

照である非形質転換イネ（日本晴）の集団と比較して生育がよく、4週間～8週間には非形質転換イネ（日本晴）の集団と比較してPs UGE導入イネの集団は明らかに生存する個体の多いことが分かった。6週間～8週間には、種子をつける個体がPs UGE導入イネの集団に認められた（図14）。図15は、Ps UGE遺伝子導入イネの塩ストレス条件での栽培6週間後の出穂状態を示す。

【0091】

また、生存率、枯死率、穂のついた個体数の比率、穂あたりの種子数を表3にまとめた。Ps UGE遺伝子の確認されたF1集団（F1 Ps UGE+）は、対照区（Ps UGE遺伝子の確認されないF1集団（F1 Ps UGE-）、日本晴、コシヒカリ、IR28）に比べて生存率が有意に高く、穂のついた個体数も多かった。対照区においてはいずれの集団においても、F1 Ps UGE+より生存率が上回ることにはなかった。

また、この条件で日本晴群、コシヒカリ群、及びIR28群では全く種子をつけない（その前に枯れた）。F1 Ps UGE+は、F1 Ps UGE-と比較しても、穂のついた個体数が顕著に増加し、コメの収量が増大するほどの強い耐塩性の付与効果が認められた。これは、Ps UGE遺伝子が生存率でみた耐塩性向上効果を持つもののみならず、長期的な栽培で収量をも向上させる耐塩性効果を有することを示している。

【0092】

【表 3】

Ps UGE 遺伝子導入日本晴 To とコシヒカリを交配して得た F1 世代における
塩ストレス耐性評価

	系統または品種	枯死率	生存率	供試個体数	塩の付いた個体数 (比率: %)	穂当たりの種子数 (最小-平均-最大)
F1	PsUGE+ (2wks)	6.2	93.8	81	-	-
F1	PsUGE+ (4wks)	18.5	81.6	81	-	-
F1	PsUGE+ (8wks)	44.4	55.6	81	44(54.3)	1-0.6-5
F1	PsUGE- (2wks)	72.3	27.7	112	-	-
F1	PsUGE- (4wks)	91.0	9.0	112	-	-
F1	PsUGE- (8wks)	98.2	1.8	112	2(1.8)	2-4.0-6
-	コシヒカリ (2wks)	83.3	16.7	6	-	-
-	コシヒカリ (4wks)	100.0	0.0	6	-	-
-	コシヒカリ (8wks)	100.0	0.0	6	0(0)	-
-	日本晴 (8wks)	70.0	30.0	6	0(0)	-
-	IR28 (8wks)	100.0	0.0	6	0(0)	-

【0093】

(実施例 6) Ps UGE 遺伝子の選抜マーカーとしての利用

実施例 3 に示した方法を用いてエレクトロポレーション法により発現ベクター Ps UGE1a/pBI221Hm をイネプロトプラストに導入した。このプロトプラストよりカルスを再生させ、さらに抗生物質ハイグロマイシンを含まない状態で 2～6 週間かけて再分化させ、再分化させた植物体を、シュクロースを 0 mM とし、10 mM～200 mM の範囲のガラクトースを含む抗生物質の入っていないホルモンフリー培地 (西村と島本ら、同上) に植え 1～2 週間育成した。植え付けた 40000 個体の再分化植物体中、6 個体が発根し生育も旺盛であった。これらの 6 個体について導入した Ps UGE の内部配列プライマー (配列番号 12 及び 13) と発現ベクター Ps UGE1a/pBI221Hm により Ps UGE 遺伝子と同時に導入されるハイグロマイシン抵抗性 (HPT) 遺伝子のプライマー (センスプライマー: 5'-ATG AAA AAG CCT GAA CT C AC-3' (配列番号 14)、アンチセンスプライマー: 5'-CGA ACC CGC TCG TCT GGC TA-3' (配列番号 15)) を用いてゲノム PCR による遺伝子導入の確認を行った (PCR 条件は実施例 3 を参照)。図 16 に示すように、全ての個体で Ps UGE 遺伝子の 226 バンドとともに、ハイグロマイシン抵抗性 (HPT) 遺伝子の内部配列 400 bp のバンドが得られた。

以上の実験から、安全性の高い植物由来のPs遺伝子をマーカー遺伝子とし、抗生物質と比較して人体に影響の少ない糖であるガラクトースを用いることによってイネ科組換え植物体の選抜が可能であることがわかった。

【 0 0 9 4 】

【発明の効果】

本発明によれば、塩ストレス耐性を付与できる遺伝子が提供される。本遺伝子をイネなどの植物に導入することにより、塩ストレスの環境下で長期間生育し、種子をつけることのできる耐塩性植物を作出することができる。

【 0 0 9 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAISEI CORPORATION

<120> Gene conferring tolerance to salt stress

<130> P03-0142

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1554

<212> DNA

<213> Seashore Paspalum

<220>

<221> CDS

<222> (131)..(1222)

<400> 1

ggcacgagga gcgccgccgc cggttgccag acactgccag tgcaacagag ccgcaaaacc 60

acacgcccc tcgcgcgctc acacagagag agacacacag atcgatcgag cggccggccg 120

gacggcgcag atg gcg atc ggc ggg gcg gag gcc ggc ggg gga ggc gcg 169

Met Ala Ile Gly Gly Ala Glu Ala Gly Gly Gly Gly Ala

1

5

10

ggg gcc agc ggc cgg agc gtg ctg gtg acg ggc ggc gcg ggg ttc atc 217

Gly Ala Ser Gly Arg Ser Val Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly Phe Ile

15

20

25

ggc acg cac acg gcg ctg cgc ctg ctg gag cag ggc tac ggc gtc acc 265

Gly Thr His Thr Ala Leu Arg Leu Leu Glu Gln Gly Tyr Gly Val Thr

30

35

40

45

gtc gtc gac aac ttc cac aac tcc gtc ccc gag gcg ctc gaa cgc gtc 313

Val Val Asp Asn Phe His Asn Ser Val Pro Glu Ala Leu Glu Arg Val

50

55

60

cgc ctc atc gcc ggg ccc gcg ctc tcc gcc cgc ctc gac ttc atc cgg 361

Arg Leu Ile Ala Gly Pro Ala Leu Ser Ala Arg Leu Asp Phe Ile Arg

65

70

75

ggg gat ctg agg agc gcc ggg gac ttg gag aag gcg ttc gcg gcc agg 409

Gly Asp Leu Arg Ser Ala Gly Asp Leu Glu Lys Ala Phe Ala Ala Arg

80

85

90

agg tac gac gcc gtc gtc cac ttc gcg ggg ctc aag gcc gtc ggg gag 457

Arg Tyr Asp Ala Val Val His Phe Ala Gly Leu Lys Ala Val Gly Glu

95

100

105

agc gtc gcg cgc ccg gac atg tac tac gag aac aac ctc gcc ggc acc 505

Ser Val Ala Arg Pro Asp Met Tyr Tyr Glu Asn Asn Leu Ala Gly Thr

110

115

120

125

atc aac ctc tac aag gcc atg aac gag cac ggc tgc aag aag atg gtg 553

Ile Asn Leu Tyr Lys Ala Met Asn Glu His Gly Cys Lys Lys Met Val

130

135

140

ttc tcg tcg tcc gcg acc gtg tac ggc tgg ccg gag gtg atc ccg tgc 601

Phe Ser Ser Ser Ala Thr Val Tyr Gly Trp Pro Glu Val Ile Pro Cys

145

150

155

gtc gag gac tcc aag ctg cag gcc gcc aac ccc tac ggc agg acc aag 649

Val Glu Asp Ser Lys Leu Gln Ala Ala Asn Pro Tyr Gly Arg Thr Lys

160

165

170

ctc atc ctg gag gag ttg gcg cgg gac tac cag cgc gcg gac ccg ggc 697

Leu Ile Leu Glu Glu Leu Ala Arg Asp Tyr Gln Arg Ala Asp Pro Gly

175

180

185

tgg agc atc gtc ctg ctg cgc tac ttc aac ccc atc ggc gcc cac agc 745

Trp Ser Ile Val Leu Leu Arg Tyr Phe Asn Pro Ile Gly Ala His Ser

190

195

200

205

tcc ggc gag atc ggc gag gac ccc aag ggg gtg ccc aac aac ctg ctg 793
Ser Gly Glu Ile Gly Glu Asp Pro Lys Gly Val Pro Asn Asn Leu Leu
210 215 220

ccc tac atc cag cag gtc gcc gtc ggc agg ctc ccc gag ctc aac gtc 841
Pro Tyr Ile Gln Gln Val Ala Val Gly Arg Leu Pro Glu Leu Asn Val
225 230 235

tac ggc cac gat tac ccc acc cgt gac ggc acc gcg atc agg gac tac 889
Tyr Gly His Asp Tyr Pro Thr Arg Asp Gly Thr Ala Ile Arg Asp Tyr
240 245 250

ata cac gtc gtc gac ctg gcc gac ggg cac atc gcg gcg ctg aac aag 937
Ile His Val Val Asp Leu Ala Asp Gly His Ile Ala Ala Leu Asn Lys
255 260 265

ctg ttc gac act cct gat ttc ggt tgt gtg gcc tac aat ctg ggc aca 985
Leu Phe Asp Thr Pro Asp Phe Gly Cys Val Ala Tyr Asn Leu Gly Thr
270 275 280 285

ggg cgc ggc aca tcc gtt ctc gag atg gtg gcg gcg ttc aag aag gca 1033
Gly Arg Gly Thr Ser Val Leu Glu Met Val Ala Ala Phe Lys Lys Ala
290 295 300

tcc ggc aag gag atc ccc acc aag atg tgc ccc agg aga ccg ggt gac 1081
Ser Gly Lys Glu Ile Pro Thr Lys Met Cys Pro Arg Arg Pro Gly Asp
305 310 315

gcg acg gag gtt tac gcg tcc act gag aag gcc gaa agg gag ctc gga 1129

Ala Thr Glu Val Tyr Ala Ser Thr Glu Lys Ala Glu Arg Glu Leu Gly

320

325

330

tgg agg gcc cag tat gga atc gag gag atg tgc agg gac cag tgg aac 1177

Trp Arg Ala Gln Tyr Gly Ile Glu Glu Met Cys Arg Asp Gln Trp Asn

335

340

345

tgg gcc aag aag aac ccc tat ggc tac tgc ggc act gcc gaa aaa 1222

Trp Ala Lys Lys Asn Pro Tyr Gly Tyr Cys Gly Thr Ala Glu Lys

350

355

360

tagagcgcgt gcattaatca gatctctgga ctgaatttgt ccatggttga tggttgtctc 1282

agacctatcg gtggaagatg taacaagtag agaccgctcg aatgtgccta gctacgaaag 1342

tttcgtacca tctctcttgt cataacctca tgtagatggc cattttattg gaattagcct 1402

tagccttcag gcccggcgct gttagccatt gcttgctatc gaggtagggtg gggttggaac 1462

tttgggcgcc ctigaacttc cattatcatc attcgcacag acggcacagt tgcgcagtga 1522

gccgttgact gcttggtgaaa aaaaaaaaaa aa

1554

<210> 2

<211> 364

<212> PRT

<213> Seashore Paspalum

<400> 2

Met Ala Ile Gly Gly Ala Glu Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ser
1 5 10 15

Gly Arg Ser Val Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly Phe Ile Gly Thr His
20 25 30

Thr Ala Leu Arg Leu Leu Glu Gln Gly Tyr Gly Val Thr Val Val Asp
35 40 45

Asn Phe His Asn Ser Val Pro Glu Ala Leu Glu Arg Val Arg Leu Ile
50 55 60

Ala Gly Pro Ala Leu Ser Ala Arg Leu Asp Phe Ile Arg Gly Asp Leu
65 70 75 80

Arg Ser Ala Gly Asp Leu Glu Lys Ala Phe Ala Ala Arg Arg Tyr Asp
85 90 95

Ala Val Val His Phe Ala Gly Leu Lys Ala Val Gly Glu Ser Val Ala
100 105 110

Arg Pro Asp Met Tyr Tyr Glu Asn Asn Leu Ala Gly Thr Ile Asn Leu
115 120 125

Tyr Lys Ala Met Asn Glu His Gly Cys Lys Lys Met Val Phe Ser Ser
130 135 140

Ser Ala Thr Val Tyr Gly Trp Pro Glu Val Ile Pro Cys Val Glu Asp

145

150

155

160

Ser Lys Leu Gln Ala Ala Asn Pro Tyr Gly Arg Thr Lys Leu Ile Leu
165 170 175

Glu Glu Leu Ala Arg Asp Tyr Gln Arg Ala Asp Pro Gly Trp Ser Ile
180 185 190

Val Leu Leu Arg Tyr Phe Asn Pro Ile Gly Ala His Ser Ser Gly Glu
195 200 205

Ile Gly Glu Asp Pro Lys Gly Val Pro Asn Asn Leu Leu Pro Tyr Ile
210 215 220

Gln Gln Val Ala Val Gly Arg Leu Pro Glu Leu Asn Val Tyr Gly His
225 230 235 240

Asp Tyr Pro Thr Arg Asp Gly Thr Ala Ile Arg Asp Tyr Ile His Val
245 250 255

Val Asp Leu Ala Asp Gly His Ile Ala Ala Leu Asn Lys Leu Phe Asp
260 265 270

Thr Pro Asp Phe Gly Cys Val Ala Tyr Asn Leu Gly Thr Gly Arg Gly
275 280 285

Thr Ser Val Leu Glu Met Val Ala Ala Phe Lys Lys Ala Ser Gly Lys
290 295 300

Glu Ile Pro Thr Lys Met Cys Pro Arg Arg Pro Gly Asp Ala Thr Glu
305 310 315 320

Val Tyr Ala Ser Thr Glu Lys Ala Glu Arg Glu Leu Gly Trp Arg Ala
325 330 335

Gln Tyr Gly Ile Glu Glu Met Cys Arg Asp Gln Trp Asn Trp Ala Lys
340 345 350

Lys Asn Pro Tyr Gly Tyr Cys Gly Thr Ala Glu Lys
355 360

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic oligonucleotide

<400> 3

ggtgcgacg actcctggag cccg

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic oligonucleotide

<400> 4

ttgacaccag accaactggt aatg

24

<210> 5

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

tgccgtgggc tccggcgggt tcgccttcca cgagcaccac gagaagaagg aggaccacaa 60
ggacgccgag gaggccggcg gcgagaagaa gcaccacttc ttcggctgat ccatctcacc 120
atctccatct cccaccccca tcgatccatt tgtgttggct ttaattccct gcgtgcatgc 180
gtgttgttga ataaggggcc ggttccatct gtacgtacgt gtactccgag acctatcgtc 240
atgtgtgtgt gtgtacgtat acctgctgtg tacatgatgg tcgtatatgc cactggacta 300
tgtgtgtgtg caactctgtt ctgatttgct atatataag 339

<210> 6

<211> 497

<212> DNA

<213> Seashore Paspalum

<400> 6

tgcagggacc agtggaactg ggccaagaag aaccctatg gctactgcgg cactgccgaa 60
aatagagcg cgtgcattaa tcagatctct ggactgaatt tgtccatggt tgatggttgt 120

ctcagaccta tcggtggaag atgtaacaag tagagaccgc tcgaatgtgc ctagctacga 180
agtttcgtac catctctctt gtcataacct catgtagatg gtcattttat tggaattagc 240
cttagccttc aggcccggcg ctgttaaaat ttgtttttaca catggatttt ctcgctacgt 300
gtgatacata ttgtgtctgt aataatcctg atcggagttt ccagtaataa aaccgatcca 360
cgacggtggc tacgccctgt gttgtagtac tgtgaatatg atgtggtaat aacaataact 420
tgcagtgaga cttcagcttt caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480
aaaaaaaaaa aaaaaaa
497

<210> 7

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

ggccgctgtg cagggaccag tggaactggg ccaagaagaa ccctatggc tactgcggca 60
ctgccgaaaa atagagcgcg tgcattaatc agatctctgg actgaatttg tccatggttg 120
atggttgtct cagacctatc ggtggaagat gtaacaagta gagaccgctc gaatgtgcct 180
agctacgaag tttcgtacca tctctcttgt cataacctca tgtagatggc cattttattg 240
gaattagcct tagccttcag gcccggcgct gttaaaatgt gttttacaca tggattttct 300
cgctacgtgt gatacatatt gtgtctgtaa taatcctgat cggagtttcc agtaataaaa 360
ccgatccacg acggtggcta cgccctgtgt tgtagt
396

<210> 8

<211> 1540

<212> DNA

<213> Seashore Paspalum

<220>

<221> CDS

<222> (110)..(1183)

<400> 8

ggcacgaggg agagattgag aggaaatcga gttcatcctc cctccacat cgccgatcat 60

agccttcct tccccgatcg ccgatccgat ccacaagcaa gcagccagg atg gtt tct 118

Met Val Ser

1

gcg gtg ctt cgt acc atc ctt gtg acg ggc ggc gcc ggc tac atc ggc 166

Ala Val Leu Arg Thr Ile Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly Tyr Ile Gly

5

10

15

agc cac acc gtg ctg ctg ctg ctg cag cag gga ttc cgc gtc gtc gtc 214

Ser His Thr Val Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gly Phe Arg Val Val Val

20

25

30

35

gtc gac aac ctc gac aac gcc tcc gac gtc gcg ctc gcc cgc gtc gcg 262

Val Asp Asn Leu Asp Asn Ala Ser Asp Val Ala Leu Ala Arg Val Ala

40

45

50

cag ctc gca gca agc agc aac ggc ggc gcc gcc aac ctc gtc ttc cac 310

Gln Leu Ala Ala Ser Ser Asn Gly Gly Ala Ala Asn Leu Val Phe His

55

60

65

aag gtt gac ctt cgc gac agg cac gcg ctg gag gac atc ttc tcc tcc 358

Lys Val Asp Leu Arg Asp Arg His Ala Leu Glu Asp Ile Phe Ser Ser
70 75 80

cac agg ttt gag gct gtg att cat ttt gct ggg ctc aaa gct gtt ggc 406
His Arg Phe Glu Ala Val Ile His Phe Ala Gly Leu Lys Ala Val Gly
85 90 95

gag agc gtg cag aag ccg ctg ctt tac tac gac aac aac ctc atc ggc 454
Glu Ser Val Gln Lys Pro Leu Leu Tyr Tyr Asp Asn Asn Leu Ile Gly
100 105 110 115

acc atc acc ctc ctc gag gtc atg gcc gca cat ggc tgc aag aag ctg 502
Thr Ile Thr Leu Leu Glu Val Met Ala Ala His Gly Cys Lys Lys Leu
120 125 130

gtg ttc tcg tca tct gca act gtc tat ggg tgg ccc aag gaa gtg cca 550
Val Phe Ser Ser Ser Ala Thr Val Tyr Gly Trp Pro Lys Glu Val Pro
135 140 145

tgc acc gaa gaa ttc cct ctt tgc gcc acc aac ccc tat ggg cga acc 598
Cys Thr Glu Glu Phe Pro Leu Cys Ala Thr Asn Pro Tyr Gly Arg Thr
150 155 160

aag ctt gtg att gaa gat atc tgc cgc gac gtc cac cgt tca gac cct 646
Lys Leu Val Ile Glu Asp Ile Cys Arg Asp Val His Arg Ser Asp Pro
165 170 175

gat tgg aag atc ata ctg ctc agg tac ttc aac cct gtt ggt gct cat 694
Asp Trp Lys Ile Ile Leu Leu Arg Tyr Phe Asn Pro Val Gly Ala His

180

185

190

195

cca agc gga cac atc ggt gaa gac ccc tct gga atc cca aac aac ctg 742

Pro Ser Gly His Ile Gly Glu Asp Pro Ser Gly Ile Pro Asn Asn Leu

200

205

210

atg ccc tat gtc cag caa gtt gcc gtt ggg agg agg cct cac ctc act 790

Met Pro Tyr Val Gln Gln Val Ala Val Gly Arg Arg Pro His Leu Thr

215

220

225

gtc tat gga acc gac tac aac aca aag gat gga act ggg gtg cgc gat 838

Val Tyr Gly Thr Asp Tyr Asn Thr Lys Asp Gly Thr Gly Val Arg Asp

230

235

240

tat atc cat gtt gtt gac ctg gcc gat ggg cac ata gca gcc ctg ggg 886

Tyr Ile His Val Val Asp Leu Ala Asp Gly His Ile Ala Ala Leu Gly

245

250

255

aag ctc tat gaa gac tct gac aga ata ggg tgt gag gta tac aac ctg 934

Lys Leu Tyr Glu Asp Ser Asp Arg Ile Gly Cys Glu Val Tyr Asn Leu

260

265

270

275

ggc aca gga aag ggg act tcg gtg ctg gaa atg gtg gct gca ttc gag 982

Gly Thr Gly Lys Gly Thr Ser Val Leu Glu Met Val Ala Ala Phe Glu

280

285

290

aag gtt tct ggc aag aaa atc cct ctg gtg ctt gct ggg cga aga cct 1030

Lys Val Ser Gly Lys Lys Ile Pro Leu Val Leu Ala Gly Arg Arg Pro

295

300

305

gga gat gca gag att gtt tat gct gca act gcc aag gcc gag aaa gag 1078
Gly Asp Ala Glu Ile Val Tyr Ala Ala Thr Ala Lys Ala Glu Lys Glu

310

315

320

ctg aaa tgg aag gcc aag tac ggg att gaa gag atg tgc aga gac cag 1126
Leu Lys Trp Lys Ala Lys Tyr Gly Ile Glu Glu Met Cys Arg Asp Gln

325

330

335

tgg aac tgg gca agc aaa aac ccc tac ggg tat gct gga tca ccc gac 1174
Trp Asn Trp Ala Ser Lys Asn Pro Tyr Gly Tyr Ala Gly Ser Pro Asp

340

345

350

355

aac agc agc tgactgaaag caaatgcatg ctatgcatga tagggagatc 1223
Asn Ser Ser

gagcagcaga ccacttacca ctgctagtaa aagaagtcga gtctcagaat accaccgtac 1283

gtatgcttac taaatagtcc gaggacggac ggacggatga tccatgtgtg gggcctcgta 1343

ttctcatttg tatagaggga cggagtagga gatccccagt cccatccatc cggcttattg 1403

ttgctaccgt caatccatgt ttaagaaata aaccctatg catgtatgct tatcgatcta 1463

ctgtactagc taattatata ggcatatgta tatttgtag attcttatac aaaaaaaaaa 1523

aaaaaaaaaa aaaaaaa

1540

<210> 9

<211> 358

<212> PRT

<213> Seashore Paspalum

<400> 9

Met Val Ser Ala Val Leu Arg Thr Ile Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly

1

5

10

15

Tyr Ile Gly Ser His Thr Val Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gly Phe Arg

20

25

30

Val Val Val Val Asp Asn Leu Asp Asn Ala Ser Asp Val Ala Leu Ala

35

40

45

Arg Val Ala Gln Leu Ala Ala Ser Ser Asn Gly Gly Ala Ala Asn Leu

50

55

60

Val Phe His Lys Val Asp Leu Arg Asp Arg His Ala Leu Glu Asp Ile

65

70

75

80

Phe Ser Ser His Arg Phe Glu Ala Val Ile His Phe Ala Gly Leu Lys

85

90

95

Ala Val Gly Glu Ser Val Gln Lys Pro Leu Leu Tyr Tyr Asp Asn Asn

100

105

110

Leu Ile Gly Thr Ile Thr Leu Leu Glu Val Met Ala Ala His Gly Cys

115

120

125

Lys Lys Leu Val Phe Ser Ser Ser Ala Thr Val Tyr Gly Trp Pro Lys
130 135 140

Glu Val Pro Cys Thr Glu Glu Phe Pro Leu Cys Ala Thr Asn Pro Tyr
145 150 155 160

Gly Arg Thr Lys Leu Val Ile Glu Asp Ile Cys Arg Asp Val His Arg
165 170 175

Ser Asp Pro Asp Trp Lys Ile Ile Leu Leu Arg Tyr Phe Asn Pro Val
180 185 190

Gly Ala His Pro Ser Gly His Ile Gly Glu Asp Pro Ser Gly Ile Pro
195 200 205

Asn Asn Leu Met Pro Tyr Val Gln Gln Val Ala Val Gly Arg Arg Pro
210 215 220

His Leu Thr Val Tyr Gly Thr Asp Tyr Asn Thr Lys Asp Gly Thr Gly
225 230 235 240

Val Arg Asp Tyr Ile His Val Val Asp Leu Ala Asp Gly His Ile Ala
245 250 255

Ala Leu Gly Lys Leu Tyr Glu Asp Ser Asp Arg Ile Gly Cys Glu Val
260 265 270

Tyr Asn Leu Gly Thr Gly Lys Gly Thr Ser Val Leu Glu Met Val Ala

275

280

285

Ala Phe Glu Lys Val Ser Gly Lys Lys Ile Pro Leu Val Leu Ala Gly

290

295

300

Arg Arg Pro Gly Asp Ala Glu Ile Val Tyr Ala Ala Thr Ala Lys Ala

305

310

315

320

Glu Lys Glu Leu Lys Trp Lys Ala Lys Tyr Gly Ile Glu Glu Met Cys

325

330

335

Arg Asp Gln Trp Asn Trp Ala Ser Lys Asn Pro Tyr Gly Tyr Ala Gly

340

345

350

Ser Pro Asp Asn Ser Ser

355

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 10

acagagccgc aaaaccacac

20

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 11

ttcgtagcta ggcacattcg agcggtg

27

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 12

gtcgtcgaca acttccacaa

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 13

ttgttctcg tagtacatgtc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 14

atgaaaaagc ctgaactcac

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220> 20

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 15

cgaacccgct cgtctggcta

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

Seashore Paspalum シバの第 1 葉から第 3 葉、及び茎と節を含む切片を示す。

【図 2】

図2 (A) はPs ABAプロンプによるノーザン解析結果、図2 (B) はPs UGEプロンプによるノーザン解析結果をそれぞれ示す。

【図3】

Ps UGE1及びPs UGE2の植物由来のUGEホモログとの系統樹（アミノ酸配列の比較）を示す。

【図4】

系統樹作成で分類されたグループ1に属するUGEホモログとPUG1及びPUG2とのアミノ酸比較を示す。

【図5】

植物用発現ベクターのPs UGE1a/pBI221の構築手順を示す。

【図6】

ゲノムPCRによる各種イネ品種におけるPs UGE遺伝子検出結果を示す（レーン1：ベクター、レーン2：非形質転換日本晴、レーン3：Ps UGE形質転換イネ、レーン4：日本晴、レーン5：IR28、レーン6：コシヒカリ、レーン7：ポッカリ）。

【図7】

Ps UGE遺伝子導入日本晴To世代、該日本晴To世代とコシヒカリを交配したF1世代におけるゲノムPCRによるPs UGE遺伝子検出結果を示す（上段：日本晴To世代、下段：日本晴To世代とコシヒカリとの交配F1世代）。

【図8】

日本晴To世代におけるRT-PCRによるPs UGE遺伝子の発現確認を示す。

【図9】

Ps UGE遺伝子導入イネ（35S:Ps UGE1a:nosT）、非形質転換イネカルス再分化個体（コントロール）について、各濃度のガラクトース添加培地で生育させた場合の発根の写真を示す。

【図10】

Ps UGE遺伝子導入イネ（35S:Ps UGE1a:nosT）、非形質転換イネカルス再分化個体（コントロール）について、ガラクトース添加培地で生育させた場合の発根の写真、不定根の数、不定根の最大長（cm）を示す。

【図 1 1】

Ps UGE遺伝子導入イネ (35S:Ps UGE1a:nosT)、非形質転換イネカルス再分化個体 (コントロール) について、ガラクトース添加培地で生育させた場合の苗条の写真、苗条の最大長 (cm)を示す。

【図 1 2】

Ps UGE遺伝子導入日本晴To世代の塩ストレス (NaCl 3000ppm)耐性評価試験の状況を示す。

【図 1 3】

Ps UGE遺伝子導入日本晴To世代の塩ストレス (NaCl 3000ppm)耐性評価結果を示す。

【図 1 4】

Ps UGE遺伝子導入イネのF1世代 (日本晴Toとコシヒカリの交配) の塩ストレス (NaCl 3000ppm)耐性評価結果を示す。

【図 1 5】

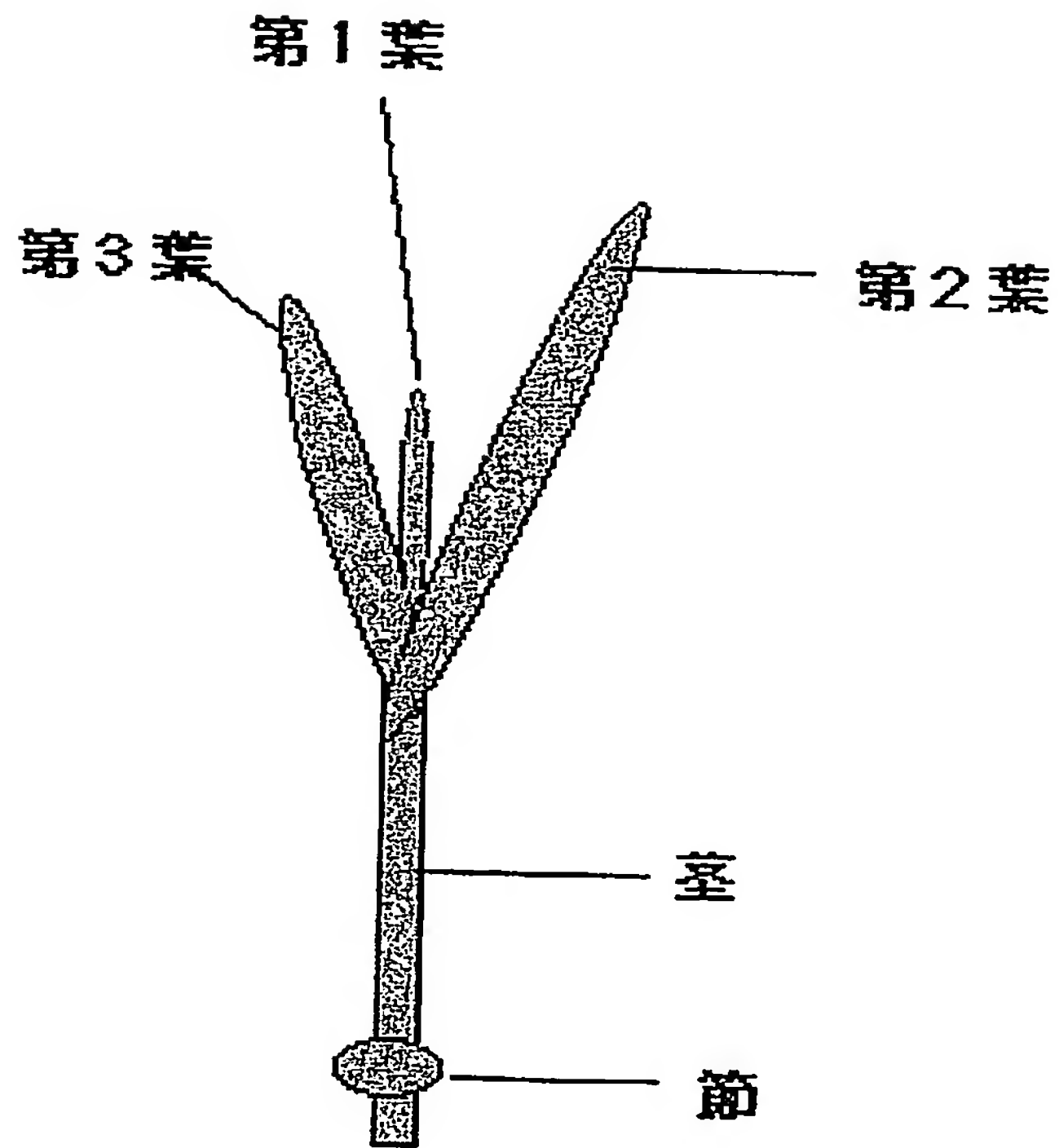
Ps UGE遺伝子導入イネ (F1世代)の塩ストレス条件での栽培6週間後の出穂状態を示す。

【図 1 6】

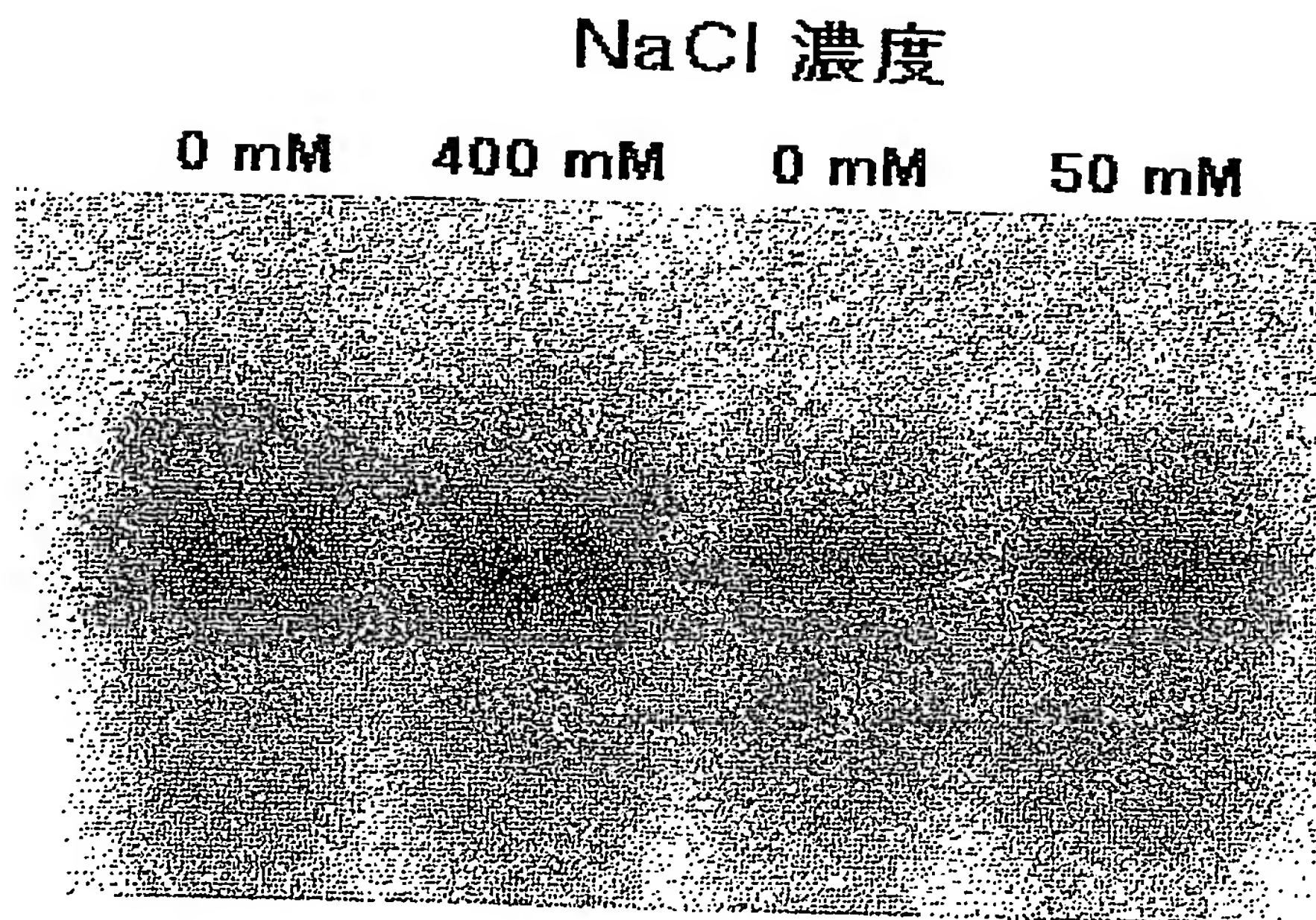
ガラクトースで選抜された個体のゲノムPCRの結果を示す (上段:Ps UGE遺伝子、下段:ハイグロマイシン抵抗性遺伝子遺伝子)。

【書類名】 図面

【図1】

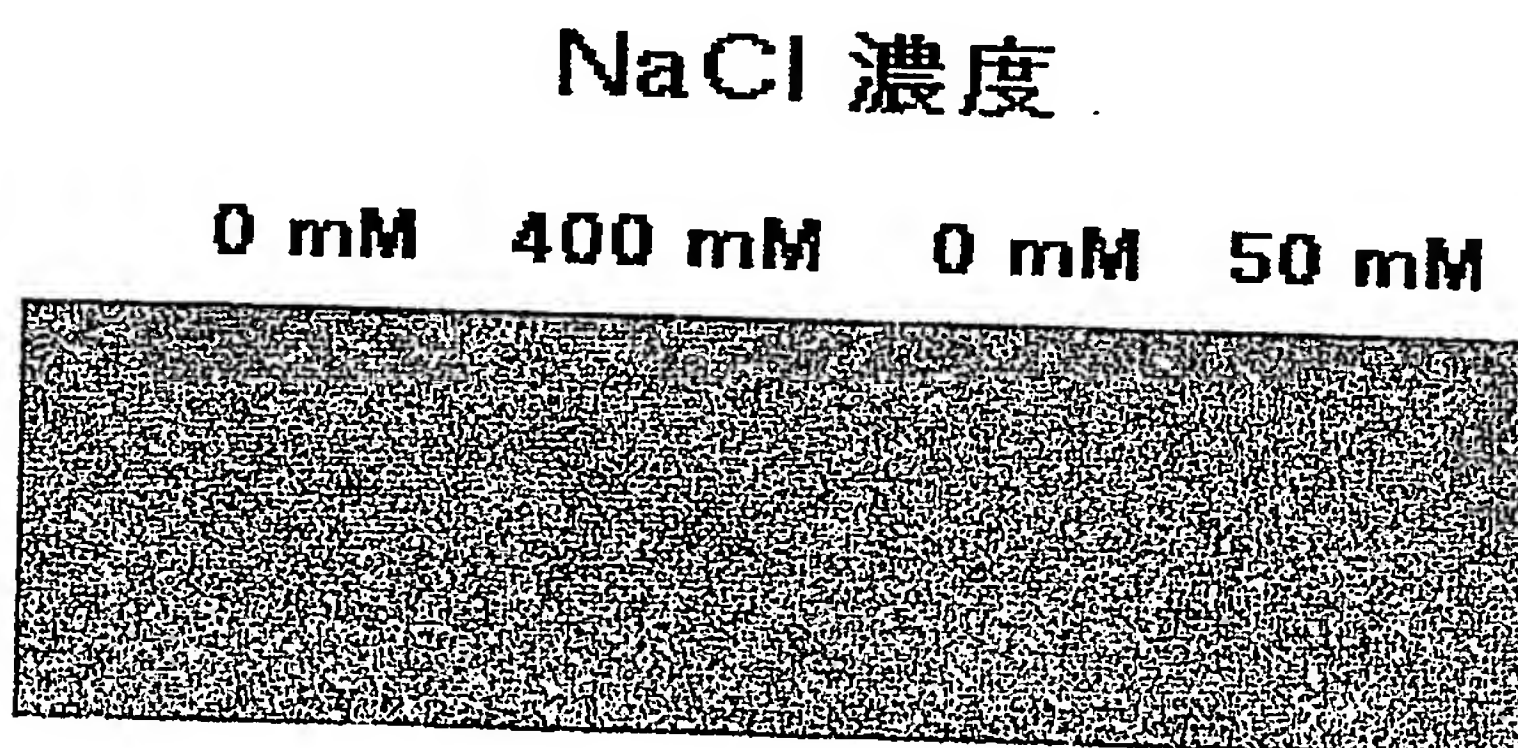


【図 2】



Paspalum イネ

(A) PsABA プローブによるノーザン解析結果



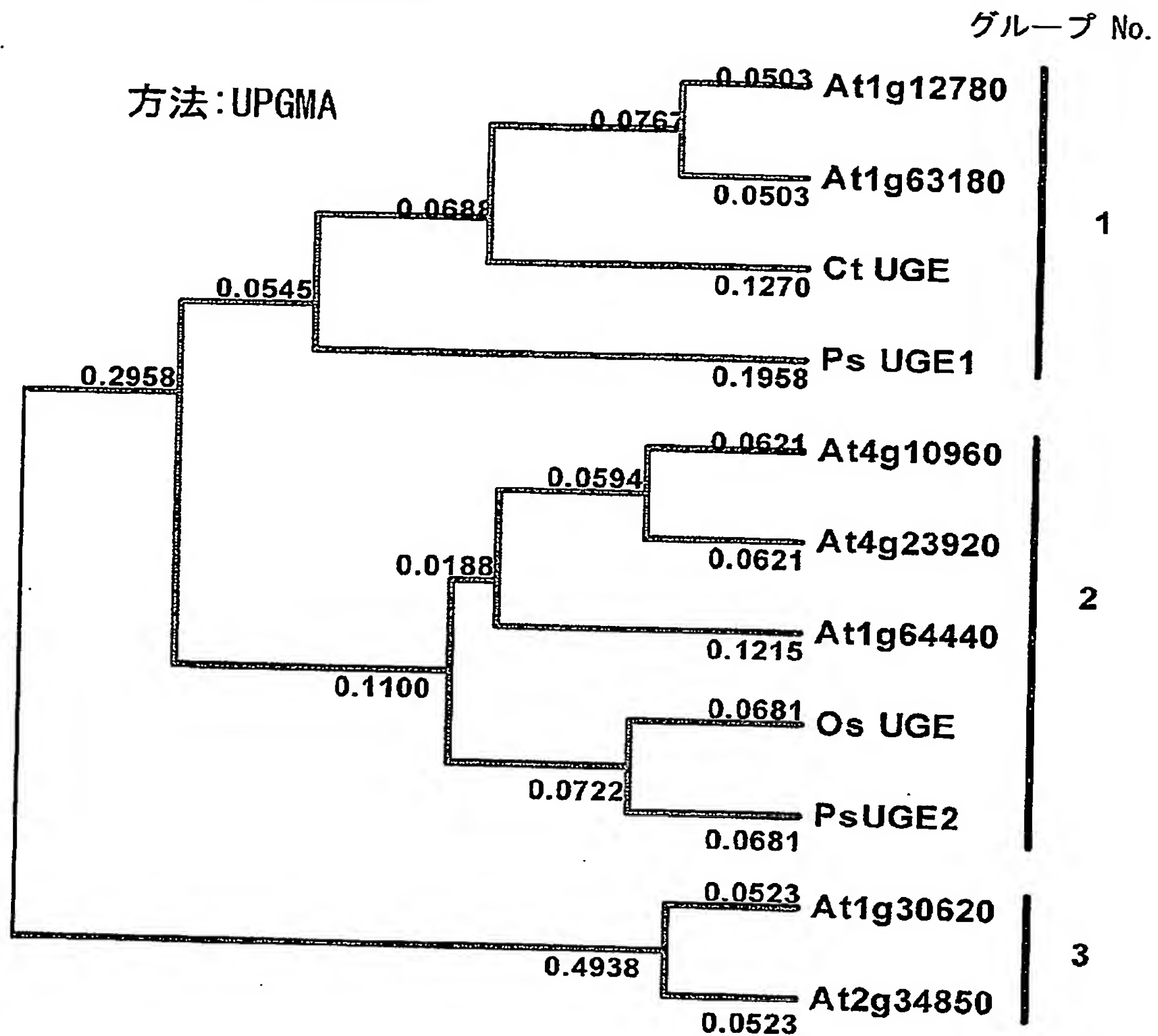
Paspalum イネ

(ポッカリ)

(B) PsUGE プローブによるノーザン解析結果

【図 3】

[GENETYX-MAC: 系統樹]

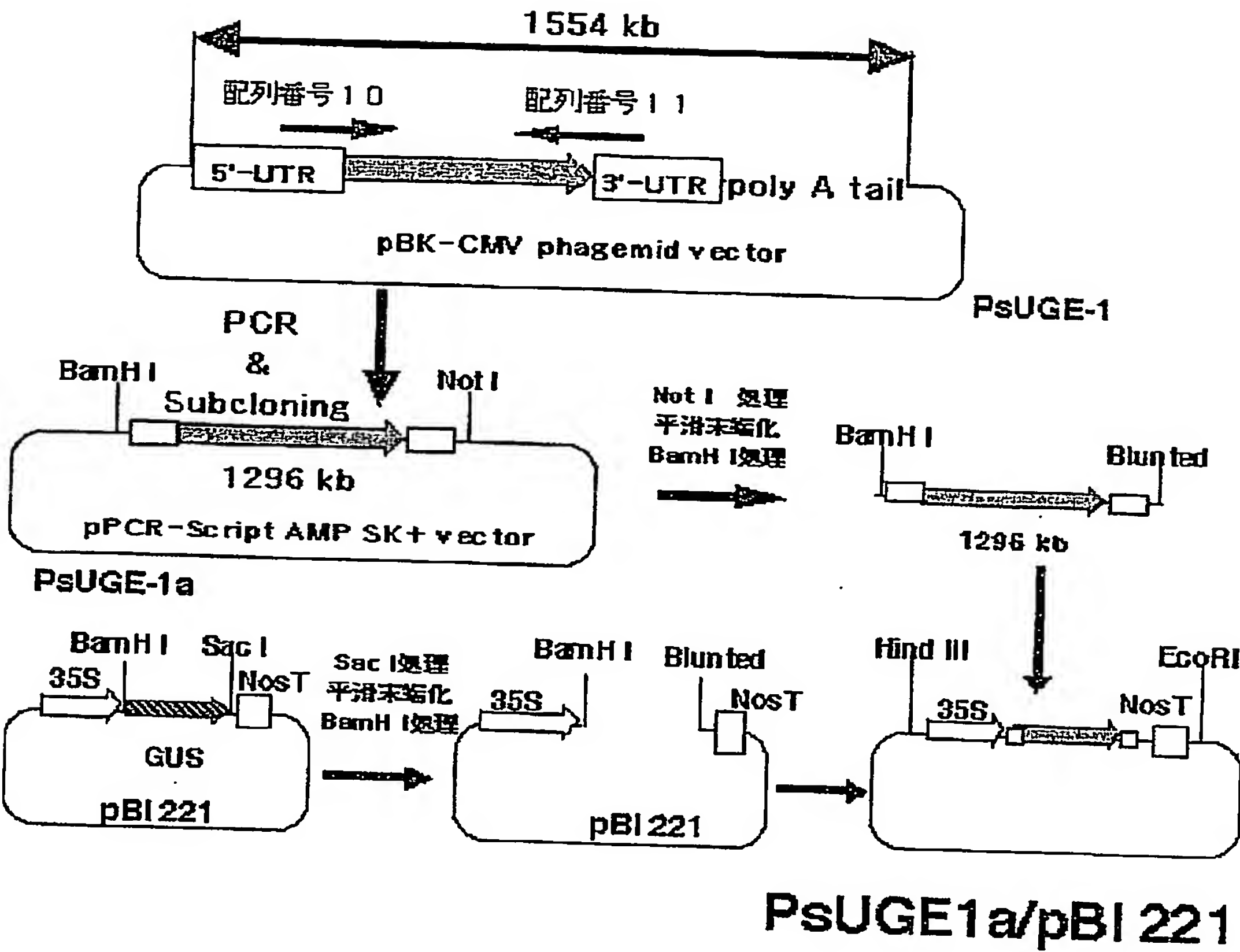


【図4】

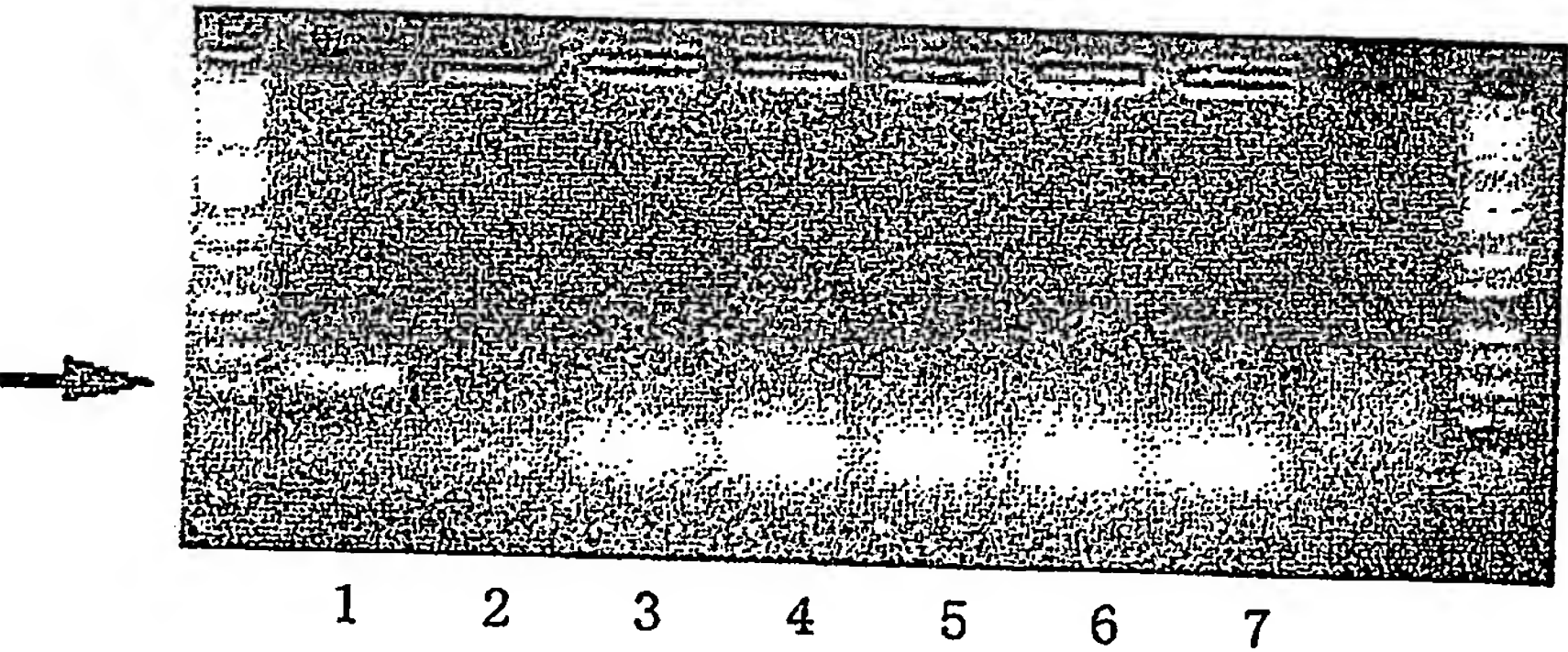
[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]
Date : 2003.03.16

Pt UGE1	1	MAIGGAERAGGGGAGAGCA-SVLTGGAGGFI GTHTALRL	59
PtUGE2	1	-----MVSAVLATIL-VTGGAGGFI GSHTVLL	48
At1g12780	1	-----IGSSVEQNI LVTGGAGGFI GTHTVQLL	48
At1g63180	1	-----IGSSVEQNI LVTGGAGGFI GTHTVQLL	48
Ct UGE	1	-----MVS-SALAGGET--ILVTGGAGGFI GSHTVQLL	48
Pt UGE1	60	AVR-IAAPAS-AR-DEIADGLASAGDEKFAAARVDAVHFAGLKAVGESVAPDM	51
PtUGE2	49	AVRQARS-SNGGARNVFAHKVLDLADHALEDIFSSHAFAEAVTHFAGLKAVGESVAPDM	116
At1g12780	49	AVR-EVGPD-S-KK-DANLGLDLANKGDIEKLFSKQAFDAVHFAGLKAVGESVAPDM	107
At1g63180	49	AVR-EVGPD-S-TK-EFNLDGLANKGDIEKLFSKQAFDAVHFAGLKAVGESVAPDM	105
Ct UGE	52	AVR-LLVGP-S-SN-HEHHGLDLANIHDLOTLSKTKEDAVHFAGLKAVGESVAPDM	105
Pt UGE1	117	YVNNLAGTINLYKAFNEHGCKMVFSSSATVYGVPEMPCVEDSKQANPYGATKLI	108
PtUGE2	108	YVNNLIGTINLEVMFAHGCKKVFSSSATVYGVPEMPCVEDSKQANPYGATKLI	176
At1g12780	106	YVNNLVGTINLYETMAKYNCKMVFSSSATVYGVPEMPCVEDSKQANPYGATKLI	167
At1g63180	106	YVNNLVGTINLYETMAKYNCKMVFSSSATVYGVPEMPCVEDSKQANPYGATKLI	165
Ct UGE	109	YVNNLVGTINLYETMAKYNCKMVFSSSATVYGVPEMPCVEDSKQANPYGATKLI	165
Pt UGE1	177	EEIARDVADAPPCISIVLLAYFNPIGAHSSGEIGEDPKGIPNNLMPYIQQVAVGALPELN	168
PtUGE2	168	EEIARDVADAPPCISIVLLAYFNPIGAHSSGEIGEDPKGIPNNLMPYIQQVAVGALPELN	236
At1g12780	166	EEIARDVADAPPCISIVLLAYFNPIGAHSSGEIGEDPKGIPNNLMPYIQQVAVGALPELN	227
At1g63180	166	EEIARDVADAPPCISIVLLAYFNPIGAHSSGEIGEDPKGIPNNLMPYIQQVAVGALPELN	225
Ct UGE	169	EEIARDVADAPPCISIVLLAYFNPIGAHSSGEIGEDPKGIPNNLMPYIQQVAVGALPELN	225
Pt UGE1	237	YVGHDPYTDGTAIDVTHWVLDAGHTAALNKLEDTPDFGCVAYNLGTGQSTSVLEMV	228
PtUGE2	228	YVGHDPYTDGTAIDVTHWVLDAGHTAALNKLEDTPDFGCVAYNLGTGQSTSVLEMV	295
At1g12780	226	YVGHDPYTDGTAIDVTHWVLDAGHTAALNKLEDTPDFGCVAYNLGTGQSTSVLEMV	287
At1g63180	226	YVGHDPYTDGTAIDVTHWVLDAGHTAALNKLEDTPDFGCVAYNLGTGQSTSVLEMV	284
Ct UGE	229	YVGHDPYTDGTAIDVTHWVLDAGHTAALNKLEDTPDFGCVAYNLGTGQSTSVLEMV	284
Pt UGE1	296	AAFEKASGKEIPITGCPARPQDATEVYASTEKAERELGWAKYGI EEMCRDQWNAKKNP	287
PtUGE2	288	AAFEKASGKEIPITGCPARPQDATEVYASTEKAERELGWAKYGI EEMCRDQWNAKKNP	355
At1g12780	285	AAFEKASGKEIPITGCPARPQDATEVYASTEKAERELGWAKYGI EEMCRDQWNAKKNP	347
At1g63180	285	AAFEKASGKEIPITGCPARPQDATEVYASTEKAERELGWAKYGI EEMCRDQWNAKKNP	344
Ct UGE	288	AAFEKASGKEIPITGCPARPQDATEVYASTEKAERELGWAKYGI EEMCRDQWNAKKNP	344
Pt UGE1	356	YGYCTAEK---	347
PtUGE2	348	YGYCTAEK---	354
At1g12780	345	YGYCTAEK---	358
At1g63180	345	YGYCTAEK---	351
Ct UGE	348	YGYCTAEK---	351

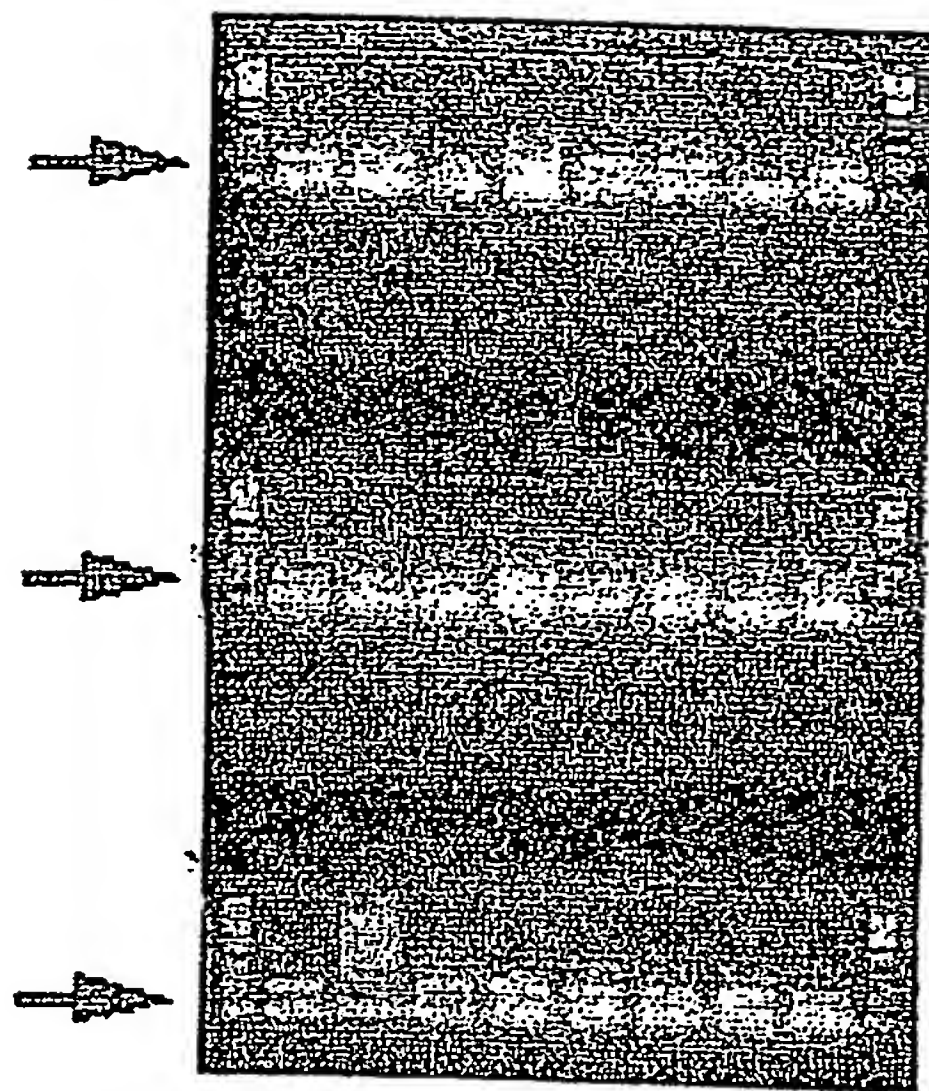
【図 5】



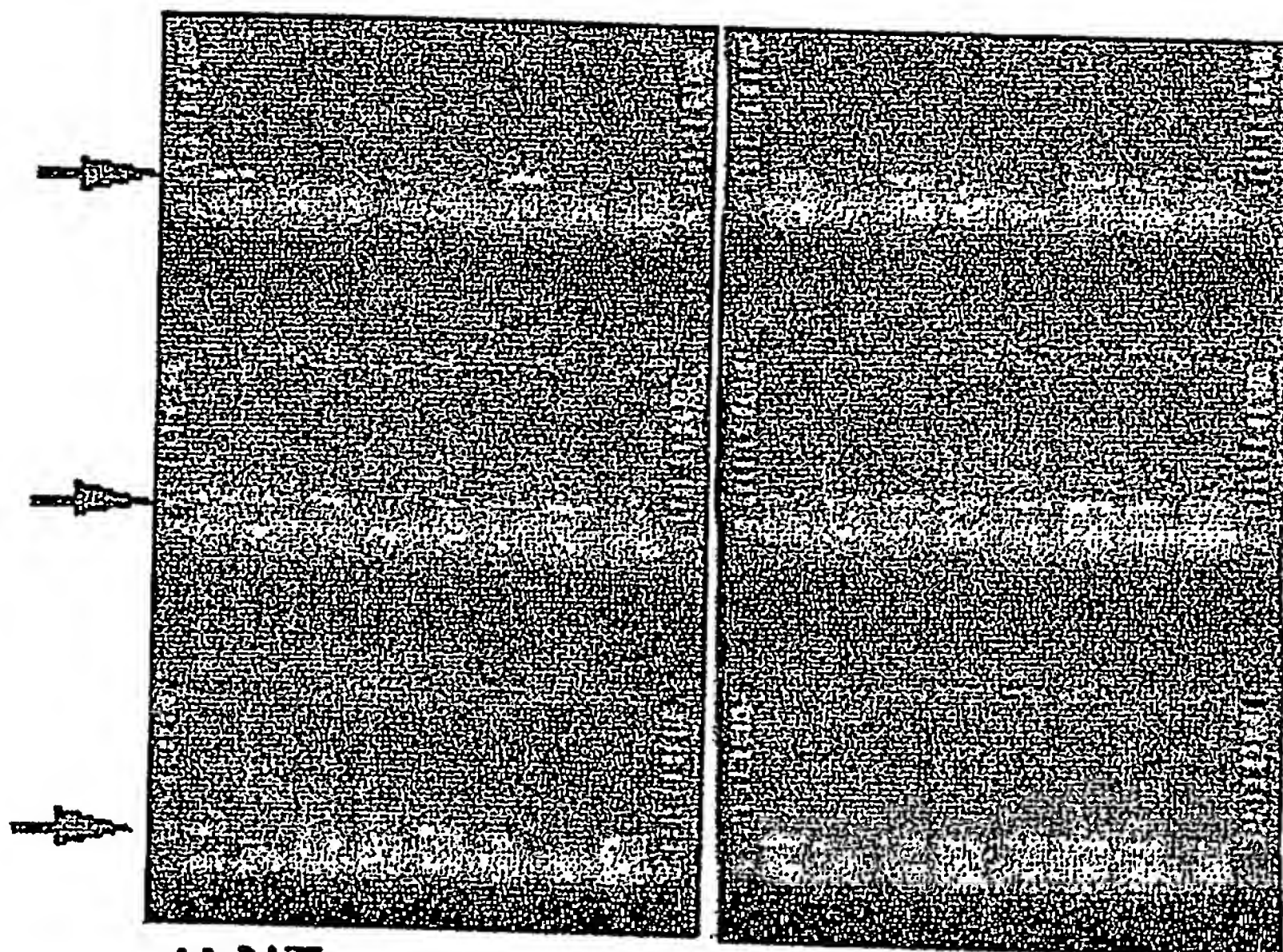
【図 6】



【図 7】



VNT

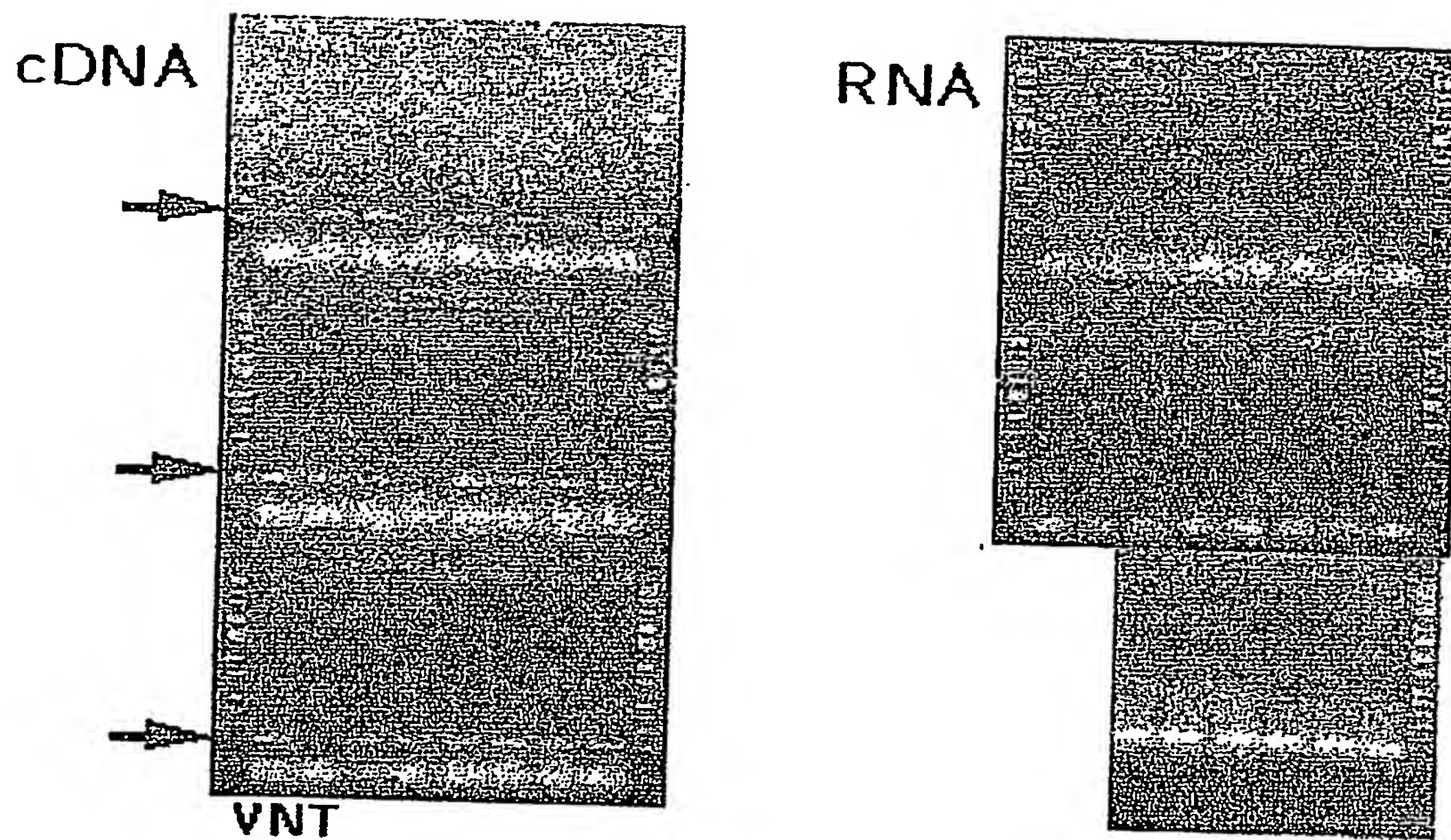


VNT

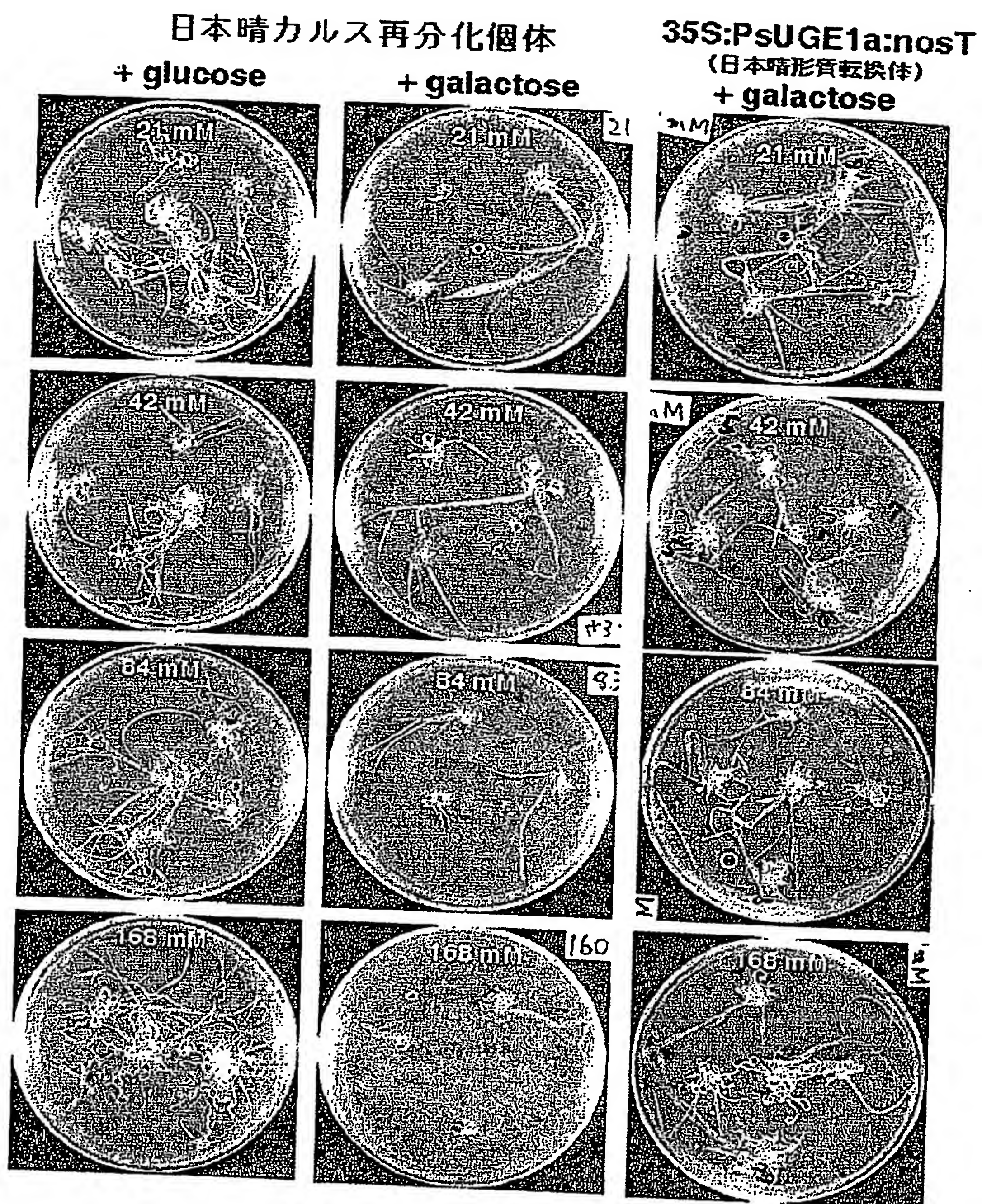
上段：日本晴の To 世代

下段：PsUGE 形質転換日本晴とコシヒカリの交配 F1 集団

【図 8】

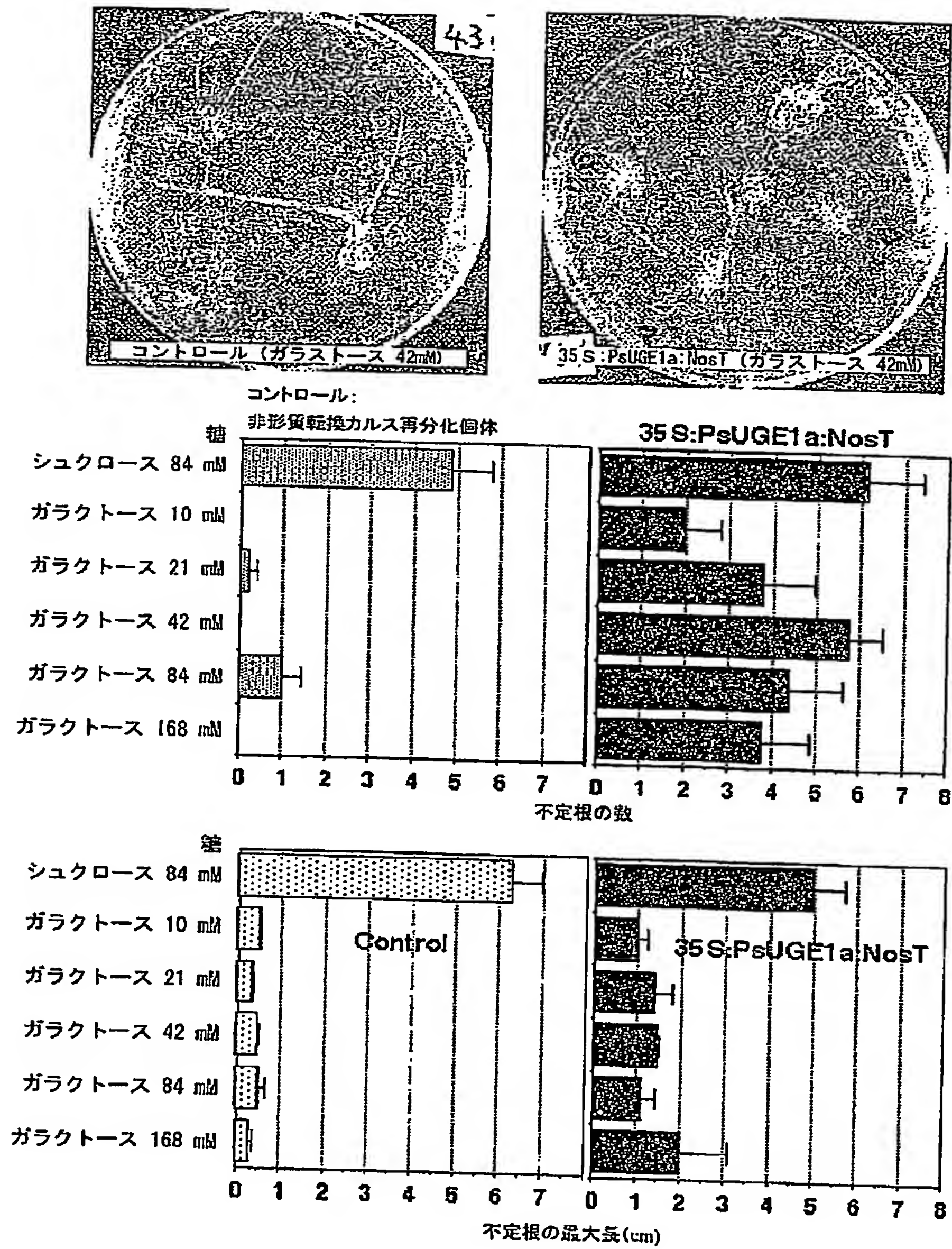


【図9】

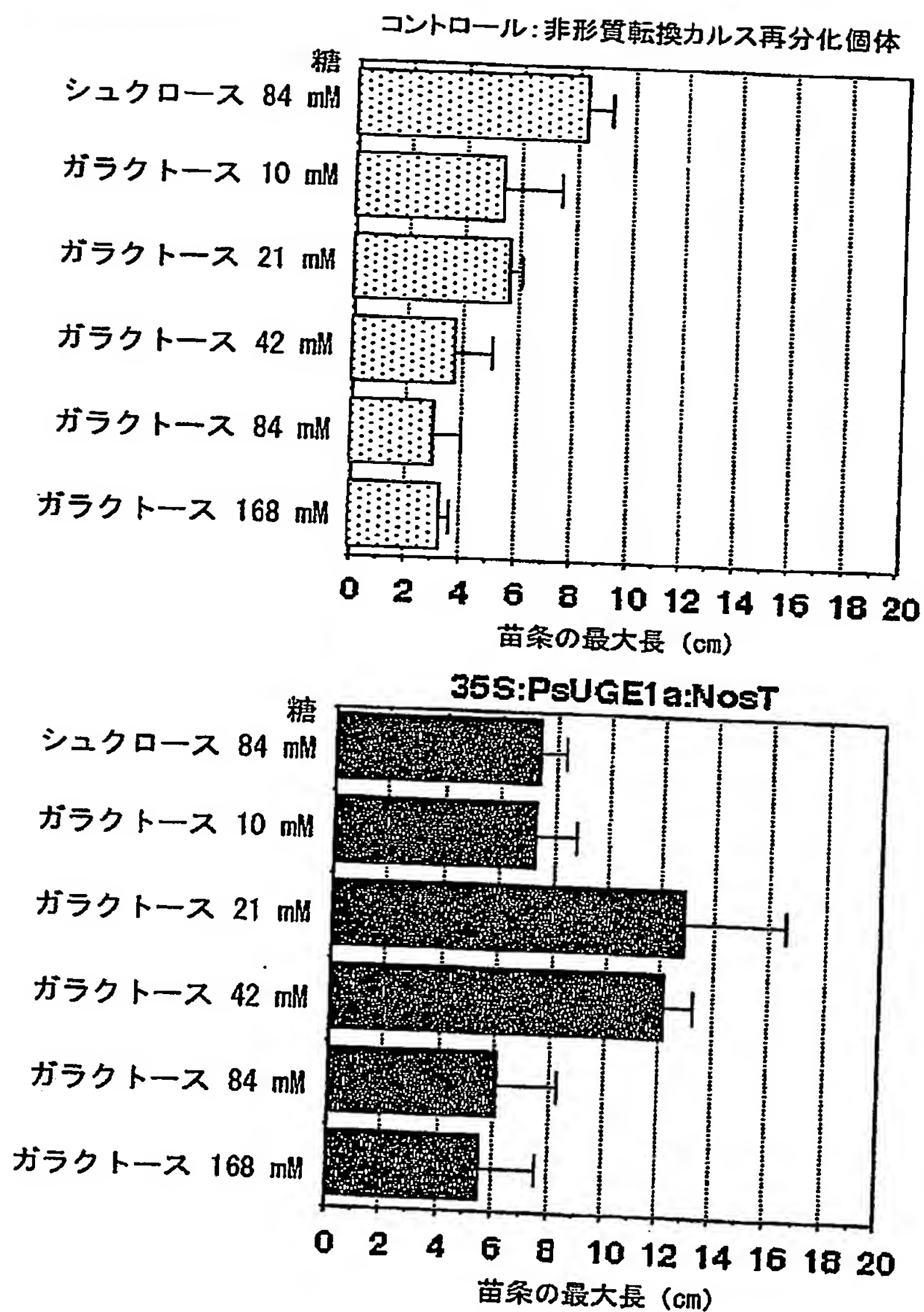
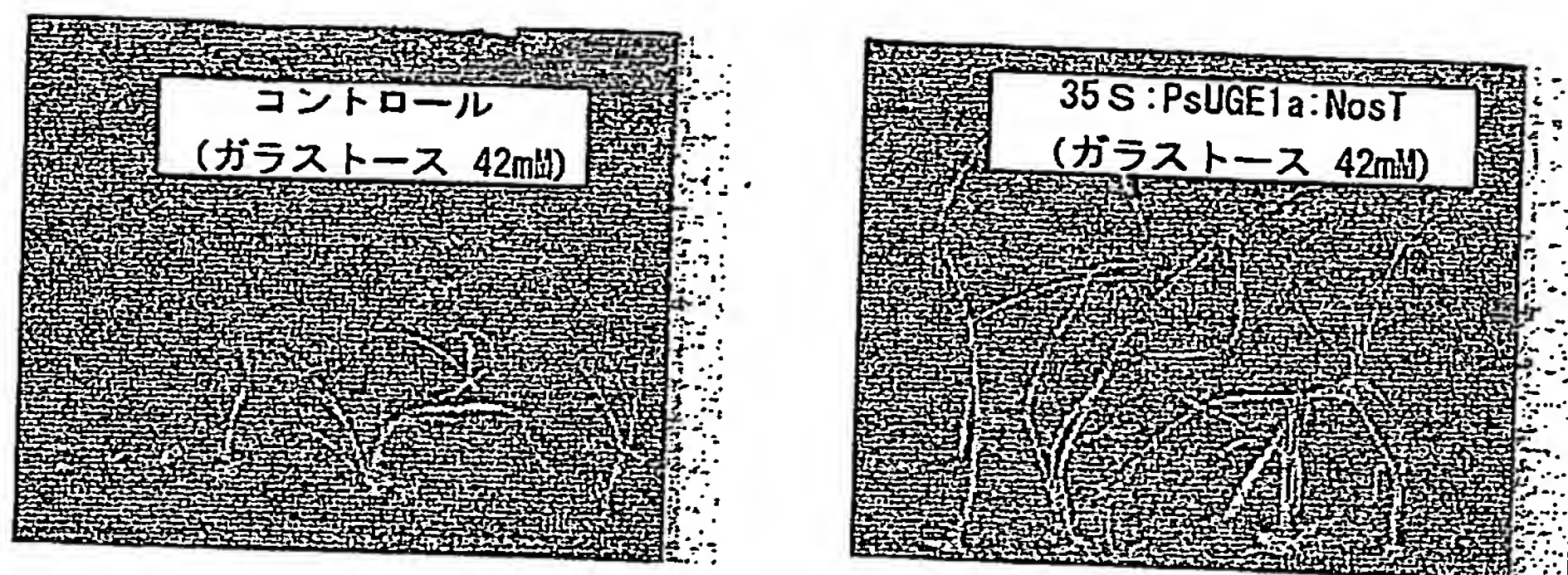


発根に対するガラクトースの影響

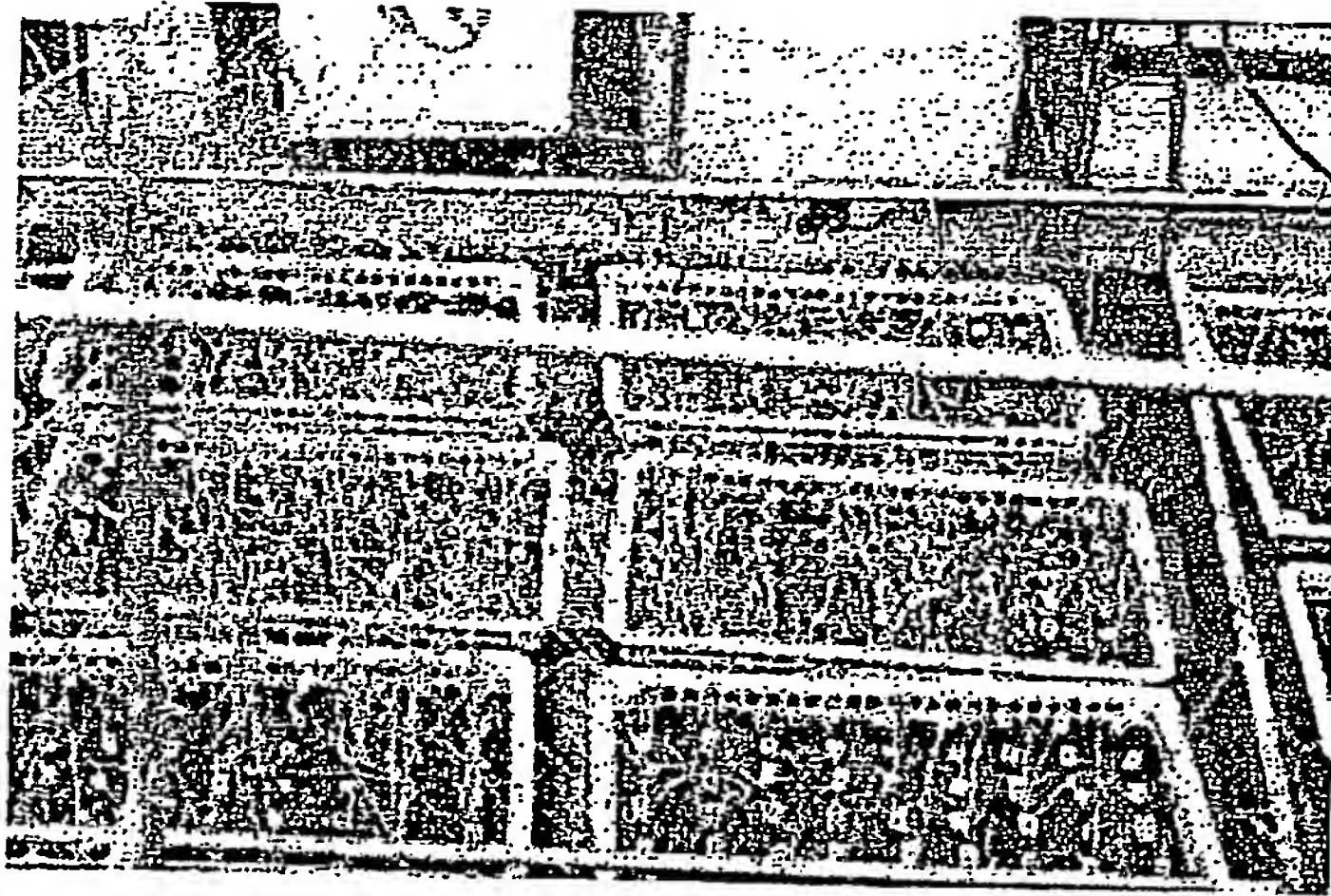
【図 10】



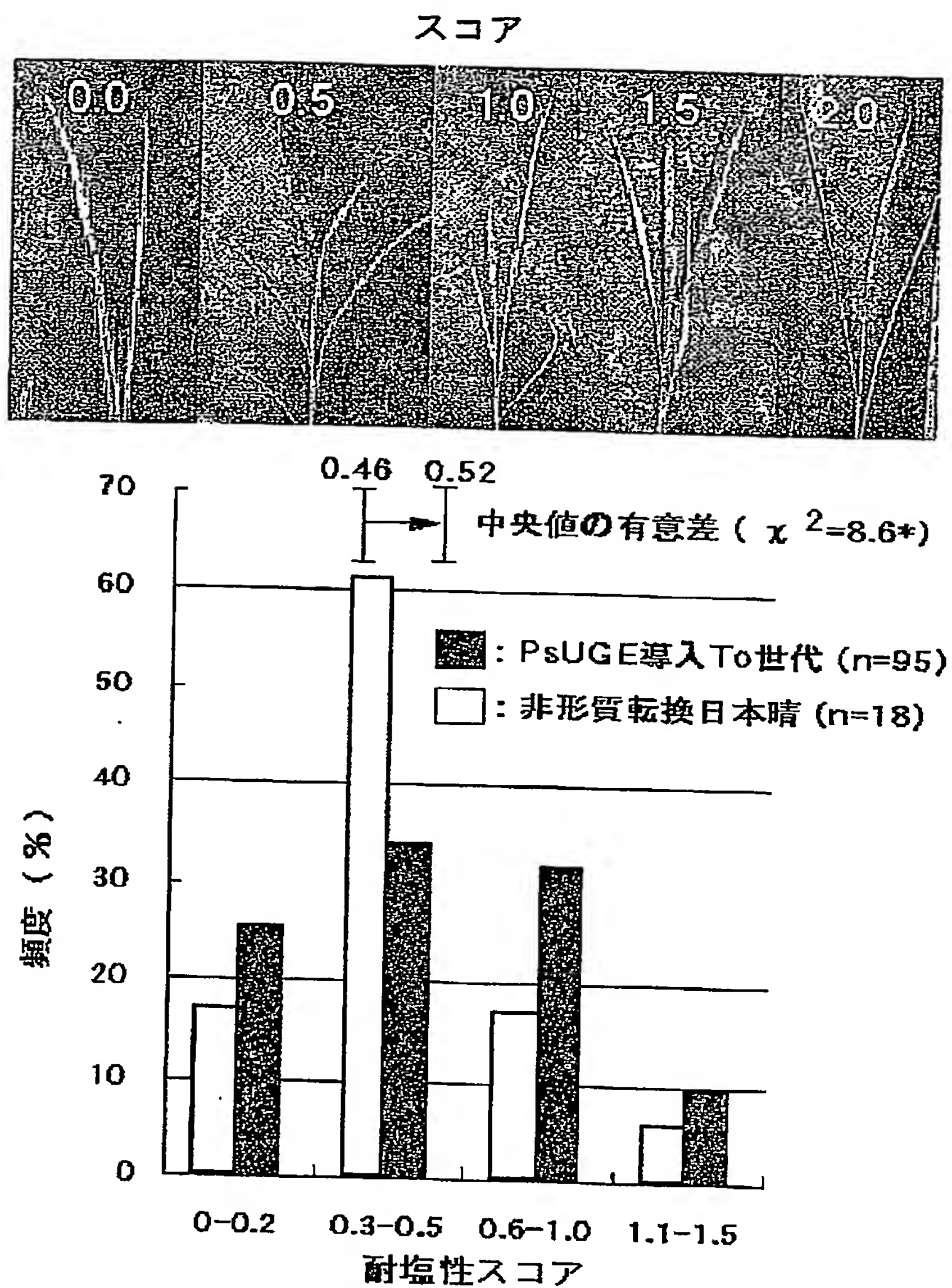
【図 11】



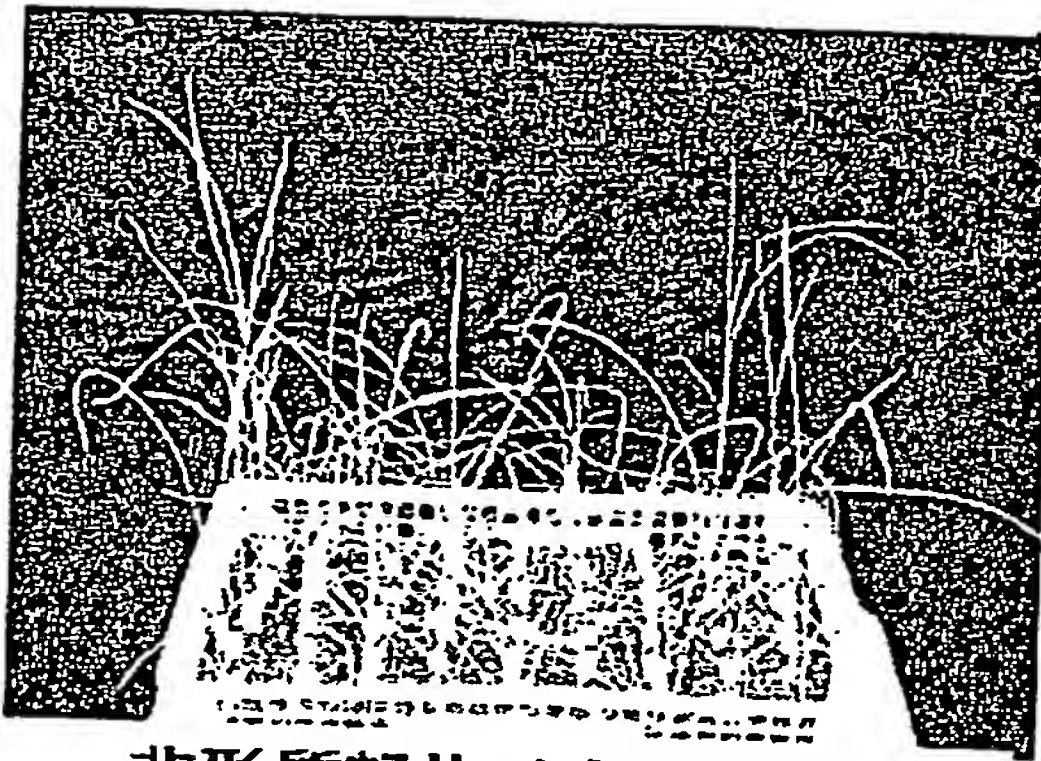
【図 12】



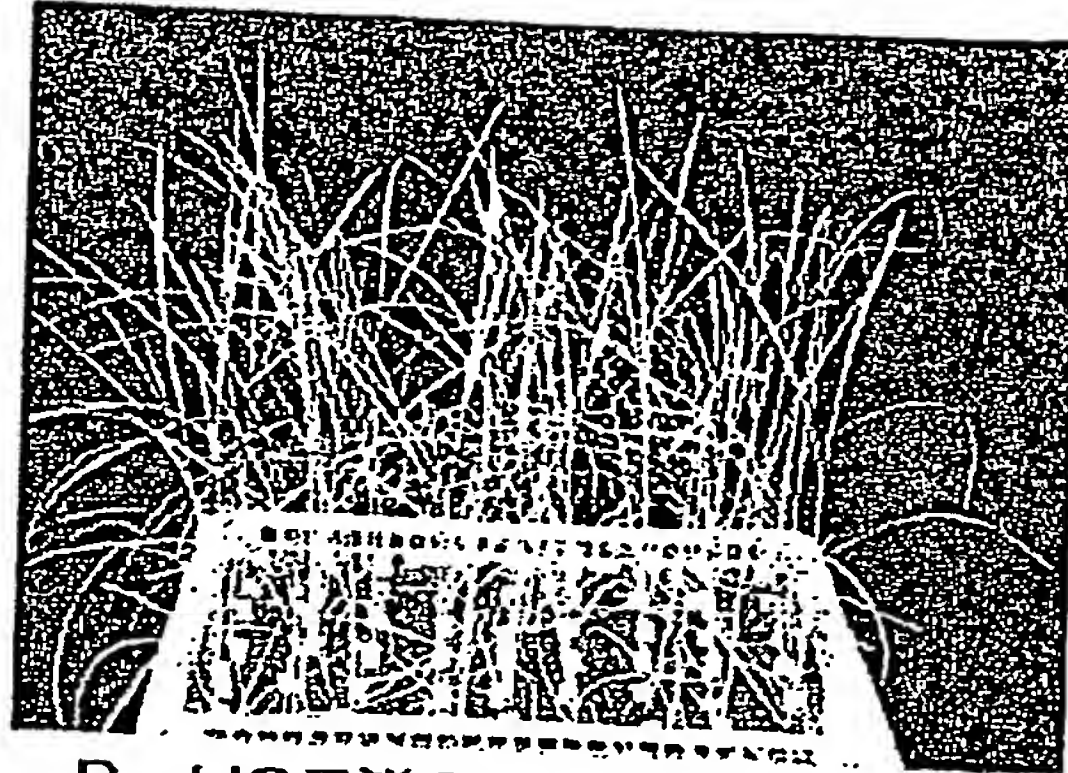
【図 13】



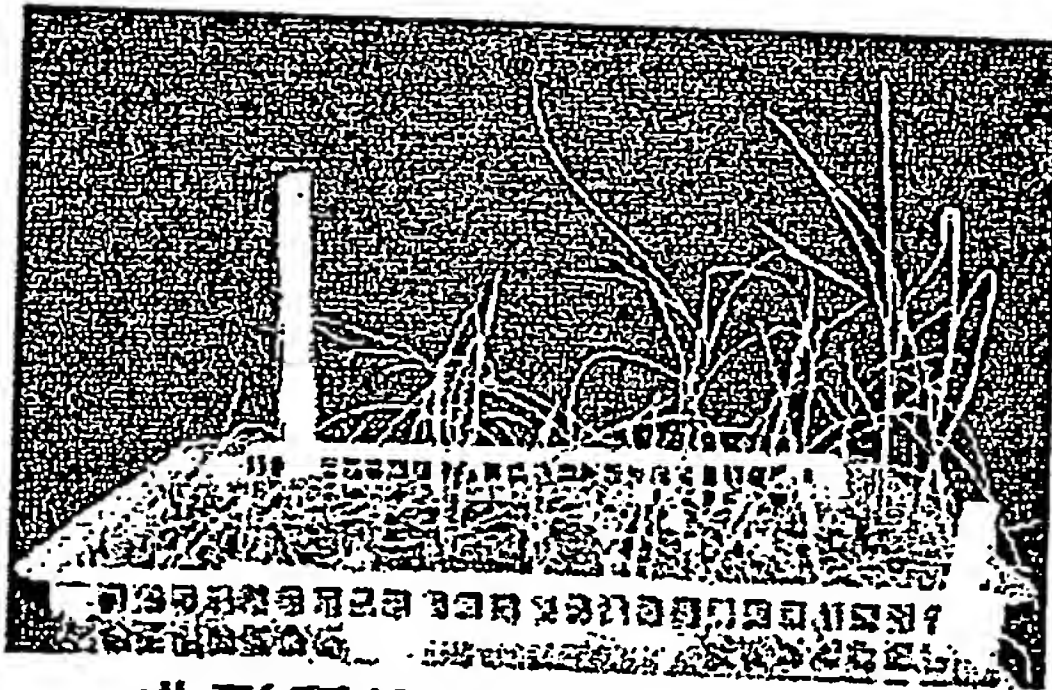
【図14】



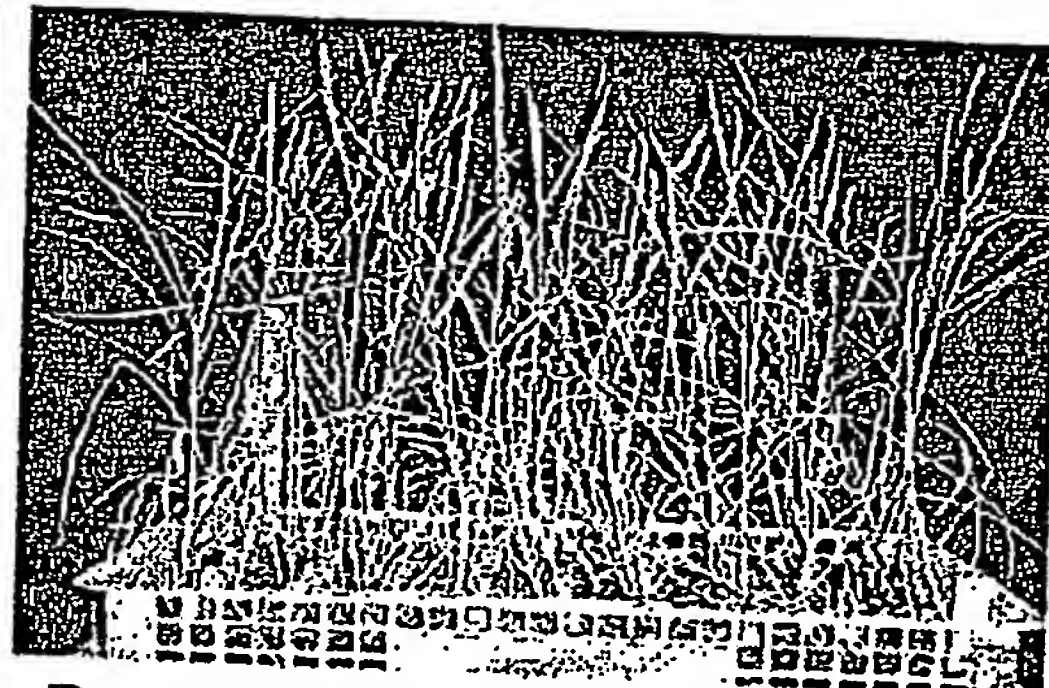
非形質転換イネ (2週間後)



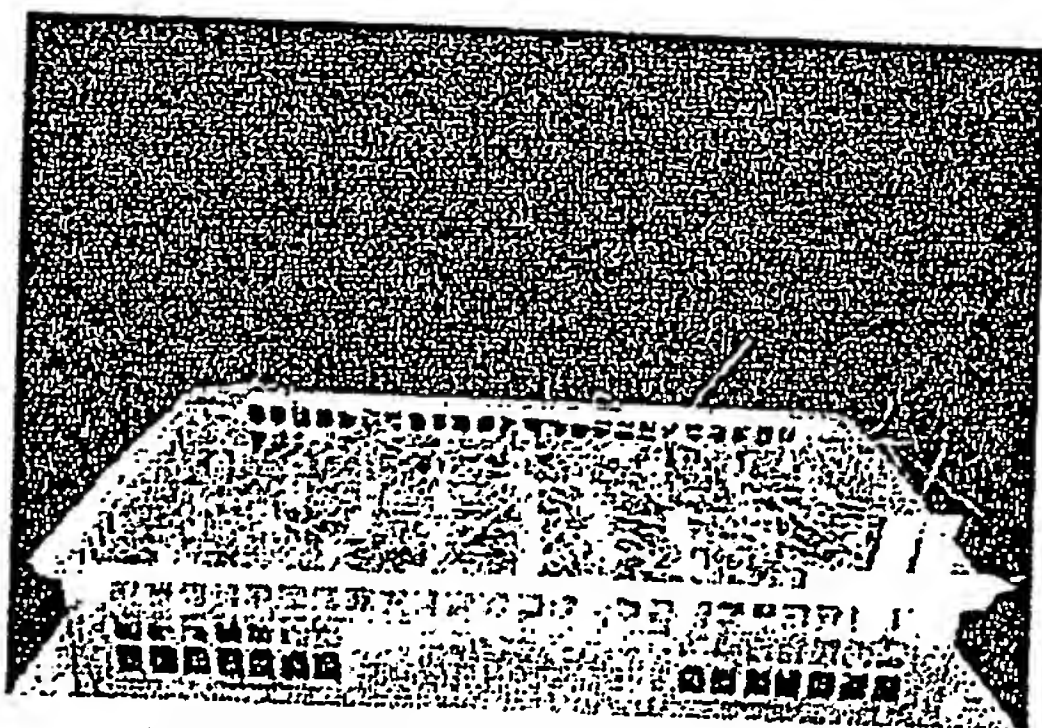
Ps UGE導入イネ (2週間後)



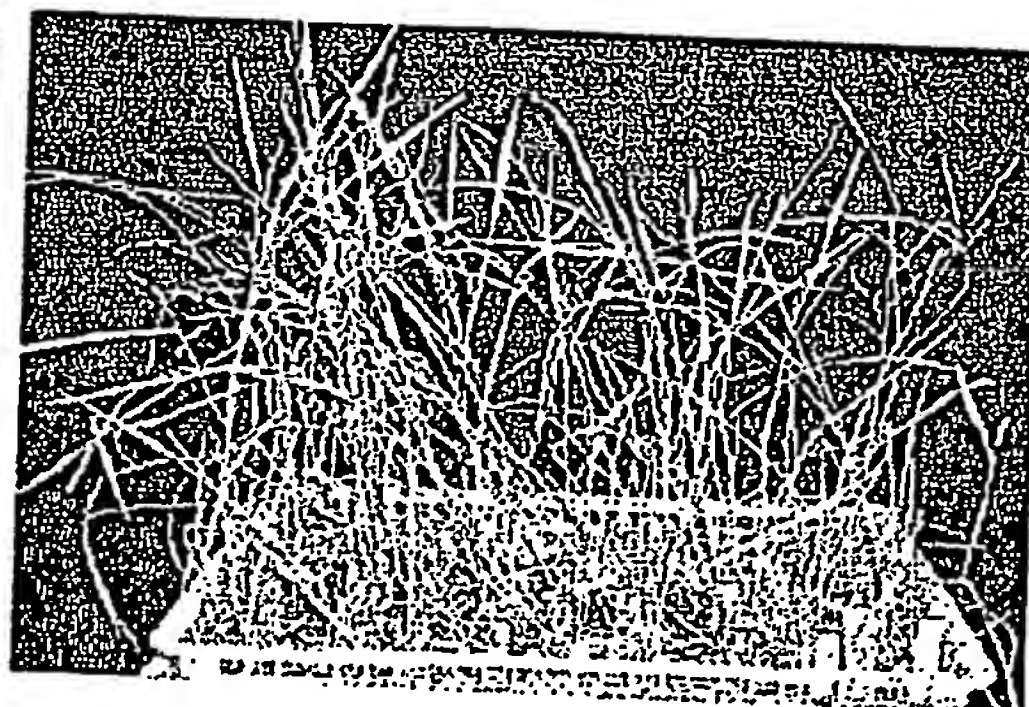
非形質転換イネ (4週間後)



Ps UGE導入イネ (4週間後)

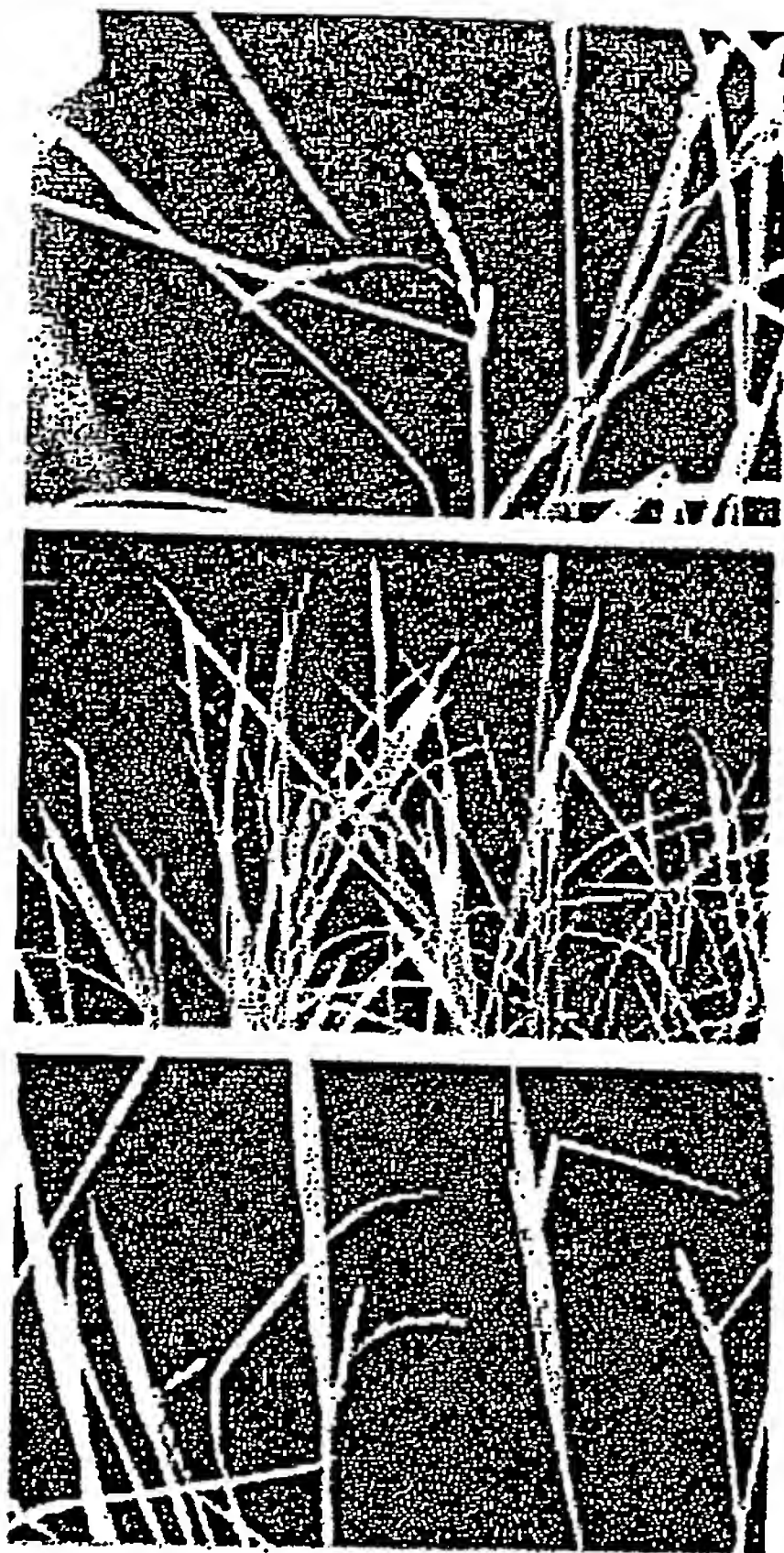


非形質転換イネ (8週間後)

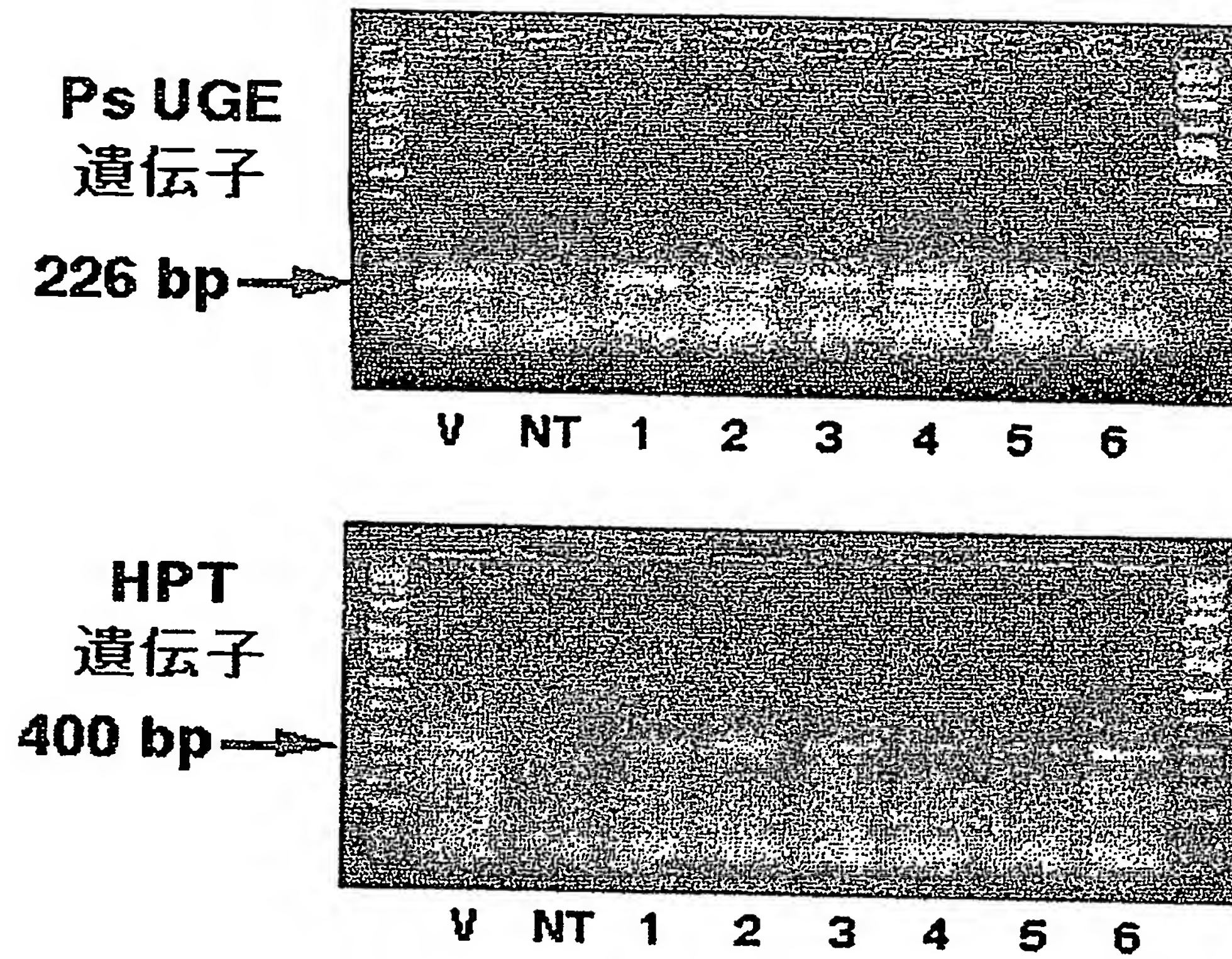


Ps UGE導入イネ (8週間後)

【図 15】



【図 16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 長期間に渡って植物に塩ストレス耐性を付与することが可能な新規な遺伝子、及び該遺伝子を導入した塩ストレス耐性形質転換植物を提供すること。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)に示すタンパク質をコードする遺伝子、及び該遺伝子を導入した塩ストレス耐性形質転換植物。

(a) 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつUDPグルコース4-エピメラーゼ活性を有するタンパク質

【選択図】 なし

特願 2003-113194

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000206211]

1. 変更年月日

1990年 8月21日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都新宿区西新宿一丁目25番1号

氏名

大成建設株式会社